



Ana Lúcia Mota Pires Sistemas compósitos de PU/ZnO para entrega de fármacos



Ana Lúcia Mota Pires

**Sistemas compósitos de PU/ZnO para entrega de
fármacos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira Da Costa, Professora auxiliar e co-orientação da Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes, Professora associada do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica (DEMaC) da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado
Professor Associado da Universidade de Aveiro

Vogais

Prof. Doutor Tito da Silva Trindade
Professor Associado C/ Agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira da Costa
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Ao longo da realização desta dissertação tive o privilégio de poder contar com a colaboração de um conjunto de pessoas, às quais gostaria de expressar toda a minha gratidão.

Gostaria de agradecer em primeiro lugar às minhas orientadoras: Prof. Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira da Costa e Prof. Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes pelo apoio ao longo deste trabalho, pelo empenho na interpretação dos resultados bem como na correção criteriosa e minuciosa desta dissertação.

Aos Colegas do *BioLab*, pela permanente disponibilidade e apoio, pela ajuda em alturas difíceis, pelos conhecimentos que me transmitiram e pelas palavras sempre amigas que dirigiram. À Erika Davim pela paciência e pelo apoio incondicional em todos os momentos, inclusive os mais difíceis e pelo acolhimento e amizade demonstrada. À Nathalie Barroca pelo carinho, atenção e amizade ao longo de todo o trabalho. E, finalmente ao Jorge Luís pela ajuda e sugestões durante a realização do trabalho.

Gostaria de agradecer à Doutora Ana Luísa pelo fornecimento das membranas de diálise bem como pela disponibilidade demonstrada. Ao Prof. Doutor José Maria Ferreira pela pronta disponibilização da estufa que foi indispensável para concluir os testes de libertação.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica pelo imenso apoio durante a realização desta dissertação.

Queria agradecer aos meus pais e irmãos pelo constante apoio, carinho e compreensão demonstrados.

E por último mas não menos importante, queria agradecer de uma forma muito especial a todos os meus amigos pelo constante apoio, momentos de descontração e diversão bem passados ao longo de toda a dissertação que foram úteis para recuperar energias e acreditar que existe sempre um novo amanhecer.

palavras-chave

Compósitos, óxido de zinco, nanopartículas, poliuretano, ibuprofeno, gentamicina, liberação de fármacos

resumo

A produção de sistemas para liberação de fármacos que integrem materiais nanométricos poderá trazer vantagens significativas no uso clínico devido ao facto de as suas reduzidas dimensões permitirem a entrega do fármaco em locais não acessíveis a transportadores com dimensão superior. Nestes sistemas é extremamente importante controlar a velocidade de liberação do fármaco. A incorporação de nanopartículas numa matriz polimérica poderá ser uma estratégia adequada para manipular a velocidade a que o fármaco é localmente entregue. O presente trabalho teve como objetivo o estudo da liberação de dois fármacos modelos, a gentamicina e o ibuprofeno, a partir de dois sistemas distintos: (i) partículas nanoestruturadas de ZnO e (ii) compósitos de (poliuretano (PU)/ZnO) produzidos por incorporação de partículas nanoestruturadas de ZnO numa matriz de PU.

Do ponto de vista experimental, o presente trabalho envolveu as seguintes etapas: (1) síntese e caracterização de partículas de ZnO, (2) incorporação de fármacos nas partículas de ZnO, (3) produção e caracterização de compósitos PU/ZnO usando as partículas carregadas com o fármaco e (4) monitorização da liberação dos fármacos nos dois sistemas, ou seja, a partir das partículas de ZnO e a partir dos compósitos PU/ZnO correspondentes, bem como da respetiva degradação no meio de liberação.

As partículas de ZnO foram produzidas por um método de precipitação química em que se seguiram os efeitos da variação da velocidade de adição de reagentes. Para esse efeito utilizou-se uma bureta e um dispersor como dispositivos alternativos para mistura dos reagentes necessários à precipitação dos pós, i.e. uma solução de um sal de zinco (ZnCl_2) e uma solução básica (NaOH). Os pós obtidos, ZnOA e ZnOP respetivamente, foram caracterizados por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) quanto à morfologia (forma e tamanho), por adsorção de gás (BET) para avaliação de área superficial específica e porosidade, e por espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier para avaliação das suas características químicas de superfície. Utilizou-se como termo de comparação nanopartículas de ZnO comerciais (ZnOC). Os resultados obtidos evidenciaram que os diferentes caudais de adição de reagentes, associados aos dois dispositivos usados, se refletiram em variações significativas de área superficial das partículas obtidas que se apresentaram como partículas nanoestruturadas de elevada área específica. Os fármacos modelos, o ibuprofeno e a gentamicina, foram incorporados nas nanoestruturas por um processo de adsorção. A sua incorporação foi avaliada por espectroscopia de infravermelhos, e de ultravioleta (UV) (ao comprimento de onda de 264 nm para o ibuprofeno e de 332 nm para a gentamicina) bem como por análise térmica, observando-se uma variação da quantidade de fármaco adsorvido consoante o tipo de pó e do próprio fármaco. As nanoestruturas carregadas de fármaco foram usadas na produção de compósitos PU/ ZnO com uma percentagem mássica de 50% de ZnO.

A preparação dos compósitos consistiu em adicionar as nanoestruturas de ZnO carregadas com o fármaco modelo a uma solução do polímero. Por evaporação do solvente obtiveram-se assim discos de compósitos de ZnO de matriz polimérica. A libertação dos fármacos a partir dos dois sistemas em análise (nanoestruturas de ZnO e compósitos PU/ZnO) foi conduzida em solução tampão de fosfatos (PBS) à temperatura de 37°C e a pH =7,4. Os resultados obtidos revelaram que ambos os sistemas, nanoestruturas de ZnO e compósitos PU/ZnO, apresentam perfis de libertação do fármaco em três estágios: um estágio inicial, com elevada velocidade de libertação, seguido de um estágio intermédio de velocidade mais lenta e por fim o último estágio com velocidade muito reduzida ou quase nula. Apesar desta semelhança observa-se também que os perfis são fortemente afetados pela incorporação das nanoestruturas na matriz polimérica dado que esta inibe fortemente a libertação do fármaco. A matriz comporta-se como uma barreira que se opõe ao transporte do fármaco, pelo que as quantidades libertadas a partir dos compósitos são significativamente inferiores às observadas no caso das nanoestruturas. Por outro lado observou-se também uma variação das quantidades de fármaco libertadas com os vários tipos de nanoestruturas em análise bem como com os respetivos compósitos. Os ensaios de degradação dos compósitos, permitiram concluir que inicialmente ocorre degradação superficial da matriz polimérica que expõe as nanopartículas mais superficiais ao fluido de libertação. No entanto após esta fase, a degradação é mais lenta e ocorre formação de precipitados de fosfatos de sódio e zinco que também dificultam a libertação uma vez que formam uma camada superficial que conjuntamente com o polímero ainda não degradado aprisiona as nanoestruturas de ZnO no interior da matriz, inibindo o posterior transporte do fármaco para o meio de libertação. Este resultado sugere que deverá ser possível controlar a quantidade de fármaco libertado mediante a manipulação da estrutura química do poliuretano por forma a torna-lo mais degradável. Estudos anteriores já haviam demonstrado que os compósitos PU/ZnO (50% de ZnO) são modelos potencialmente interessantes para terapias que em que se pretenda travar a proliferação celular, como é o caso do tratamento do cancro. Os presentes resultados demonstram que a associação da própria gentamicina a estes sistemas pode ser útil em aplicações como o tratamento de tumores ósseos como osteossarcomas pois poderá ter um efeito local inibitório de micro-organismos. O ibuprofeno poderá ser aplicado em terapias em que se pretenda minimizar o processo inflamatório. Em conclusão, os resultados obtidos sugerem a viabilidade da aplicação dos compósitos de PU/ZnO como sistemas de libertação sustentada de fármacos.

Keywords

Composite, zinc oxide, nanoparticles, polyurethane, ibuprofen, gentamicin, drug delivery

Abstract

The production of drug delivery systems that integrate nanoscale materials could bring significant advantages in clinical use since their reduced dimensions may allow to deliver the drug at locations not accessible to carriers with higher dimension. In these systems it is extremely important to control the rate of drug release. The incorporation of nanoparticles in a polymer matrix may be a suitable strategy for manipulating the rate at which the drug is locally delivered. The present study was aimed at the study of the release of two drug models, gentamycin and ibuprofen, from two distinct systems: (i) ZnO nanostructured particles and (ii) (Polyurethane (PU)/ZnO) composite produced by incorporation of nanostructured ZnO particles in a PU matrix. From the experimental point of view, this work involved the following steps: (1) synthesis and characterization of ZnO particles, (2) loading ZnO particles with the drug models, (3) production and characterization of PU / ZnO composites using the drug loaded particles and (4) monitoring the drug release in both systems, ie from ZnO particles and from the PU / ZnO composite, and its degradation in the release medium. The ZnO particles were produced by a chemical precipitation method in which the effects of varying the rate of reagents addition were followed. For this purpose a burette and a nozzle were used as alternative devices for mixing the reactants required for ZnO powders precipitation, ie a zinc salt solution (ZnCl_2) and a basic solution (NaOH). The obtained powders, ZnOA and ZnOP respectively, were characterized by scanning electron microscopy (SEM) for morphology evaluation (size and shape), by gas adsorption (BET) for assessing the specific surface area and porosity, and by infrared spectroscopy for evaluation of their surface chemistry. Commercial ZnO nanoparticles (ZnOC) were also used for comparative purposes. The obtained results showed that the different rates of reagents addition of, associated with the two used devices were reflected in significant variations of the particles surface area which were seen to be nanostructured particles of high specific area. The drugs models, ibuprofen and gentamicin were incorporated into the nanostructures by an adsorption process. The drug loading was evaluated by IR spectroscopy and by ultraviolet (UV) spectroscopy (at the wavelengths of 264 nm and 332 nm for ibuprofen and gentamicin, respectively) as well as by thermal analysis. It was observed that the amount drug adsorbed was conditioned by the type of powder and by the drug itself. The drug loaded nanostructures were used in the production of PU/ZnO composites with a ZnO weight percentage of 50%. The preparation of the composites consisted on the addition of ZnO nanostructures loaded with the drug model to a polymer solution.

The evaporation of the solvent allowed PU/ZnO composites discs to be obtained. The drug release from these two systems (ZnO nanostructures and PU/ZnO composites) was conducted in a phosphate buffer solution (PBS) at 37°C and pH=7.4. The results showed that both systems, ZnO nanostructures and PU/ZnO composites exhibit a drug release profile comprising three stages: an initial stage with high release rate followed by an intermediate stage of slower rate and finally the last stage with a very low or nearly nil rate. Despite this similarity it is also observed that the profiles are strongly affected by the incorporation of the nanostructures into the polymer matrix since this inhibits the drug release. The matrix acts as a barrier which prevents the transport of the drug, so that the quantities released from the composites are significantly lower than those observed in the case of nanostructures. Moreover a variation on the drug released quantities is also observed for the various types of nanostructure under analysis as well as for their composites. The degradation tests of the composites showed that degradation occurs first at the surface of the polymeric matrix, exposing the more superficial nanoparticles to release medium. However, after this stage, the polymer degradation becomes slower and sodium and zinc phosphates precipitation also occurs thus forming a surface layer which, together with the polymer not yet degraded, trap ZnO nanostructures within the matrix inhibiting further the drug transport into the release medium. This result suggests that it should be possible to control the amount of released drug by manipulating the chemical structure of the polyurethane in order to make it more degradable. Previous studies have shown that the composite PU/ZnO (50% ZnO) are potentially interesting models for therapies aimed at to stop cell proliferation, such as in cancer treatment. The present results demonstrate that the association of gentamicin to these systems may be useful in applications such as the treatment of bone tumors (osteosarcomas) where they may have a local effect of microorganisms inhibition. Ibuprofen may be applied in therapies where it is desired to minimize the inflammatory process. In conclusion, the results suggest the usefulness of the developed PU/ZnO composites as drugs sustained release systems.



Índice

Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	iii
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas	ix
Capítulo I.....	1
1. Introdução	3
1.1. Motivação	3
1.2. Objetivos	4
1.3. Estrutura da dissertação	5
Capítulo II.....	7
2. Revisão Bibliográfica.....	9
2.1. Sistemas de libertação de fármacos.....	9
2.2. Óxido de zinco.....	12
2.2.1. Espécies reativas de oxigénio	15
2.2.2. Nanopartículas de ZnO para libertação de fármaco	17
2.3. Poliuretano	19
2.3.1. Química dos poliuretanos.....	19
2.3.2. O Poliuretano como biomaterial.....	22
2.4. Compósito PU/ZnO	24
2.5. Fármaco.....	26
2.5.1. Ibuprofeno	26
2.5.2. Gentamicina.....	29
Capítulo III.....	35
3. Procedimento Experimental	37
3.1. Materiais e reagentes utilizados	37
3.2. Síntese de pós de ZnO	38
3.3. Carregamento das nanopartículas com fármaco	42
3.4. Produção dos compósitos PU/ZnO	43
3.5. Ensaio de libertação <i>in vitro</i>	44
3.5.1. Libertação dos fármacos a partir das NPsZnO	44
3.5.2. Libertação dos fármacos a partir dos compósitos de PU/ZnO.....	45
3.6. Técnicas de caracterização.....	46
3.6.1. Difração de Raio-X (DRX).....	46



3.6.2.	Isotérmicas de adsorção.....	47
3.6.3.	Espetroscopia de absorção atômica (AAS).....	50
3.6.4.	Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	50
3.6.5.	Análise térmica diferencial e termogravimétrica (ATD/TG).....	51
3.6.6.	Espetroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR).....	51
3.6.7.	Espetroscopia de UV	52
Capítulo IV		55
4.	Resultados e Discussão.....	57
4.1.	Caracterização dos materiais	57
4.1.1.	Nanopartículas de ZnO	57
4.1.2.	Poliuretano	63
4.1.3.	Fármacos	65
4.1.3.1.	Ibuprofeno	65
4.1.3.2.	Gentamicina.....	68
4.2.	Carregamento e caracterização das nanopartículas.....	69
4.2.1.	Caracterização das nanopartículas com ibuprofeno	73
4.2.2.	Caracterização das nanopartículas com gentamicina.....	74
4.3.	Caracterização dos compósitos de PU/ZnO	76
4.4.	Estudo da liberação de fármacos <i>in vitro</i>	79
4.4.1.	Liberação do Ibuprofeno	79
4.4.2.	Liberação da gentamicina	84
Capítulo V.....		95
5.	Conclusões e Trabalho Futuro.....	97
Bibliografia.....		101
Anexos		109



Lista de Abreviaturas e Símbolos

Símbolo/ Abreviatura	Descrição
AAS	Espetroscopia de Absorção Atômica (do inglês <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>)
ACT	Acetato de Dexametasona
AINE	Anti-Inflamatório Não Esteroide
ASE	Área Superficial Específica
ATD	Análise Térmica Diferencial
BDO	1,4 – Butanodiol
BET	Isotérmica de Braunauer-Emmett-Teller
CEF	Cefamandole Nafate
Cit	Ácido Cítrico
DEE	Diâmetro esférico equivalente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNR	Daunorubicina
DOX	Doxorubicina
DRX	Difração de raio-X
ED	1,4 – Etilenodiamina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espetroscopia de Infra Vermelhos com Transformadas de Fourier (do inglês <i>Fourier Transformer Infrared Spectroscopy</i>)
FWHM	Largura a meia altura do pico de difração (do inglês <i>full width at half maximum</i>)
Genta	Gentamicina
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro (do inglês <i>Generally Recognized as Safe</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HMDI	Difenilmetano-diisocianato Hidrogenado (do inglês <i>Hydrogenated diphenylmethane-diisocyanate</i>)



IARC	Agência Internacional de Investigação do Cancro (do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IBU	Ibuprofeno
ISO	<i>International Standardization Organization</i>
IUPAC	<i>Internacional Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Infravermelho
JCPDS/ICDD	<i>Joint Commitee on Powder Diffraction Standards/ International Centre for Diffraction Data</i>
MDI	4,4' – Diisocianato de difenilmetano (do inglês <i>Diphenylmethane-diisocyanate</i>)
NPsZnO	Nanopartículas de óxido de zinco
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPA	O-ftalaldeído ou orto- ftalaldeído
PBS	Tampão de solução salina de fosfato
PTMEG	Éter glicol de politetrametileno (do inglês <i>Polytetramethylene ether glycol</i>)
PU	Poliuretano
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i>)
Rpm	Rotações por minuto
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento (do inglês <i>Scanning electron microscope</i>)
SLC	Sistema de libertação controlada
SNC	Sistema Nervoso Central
TG	Análise Termogravimétrica
TP_{médio}	Tamanho médio de poro
UA	Unidade Arbitraria
UV-Vis	Espectroscopia de UV-Visível



Índice de Figuras

Figura 1 - Incidência e mortalidade de vários tipos de cânceros a) no homem e b) na mulher. Adaptado de [2].....	3
Figura 2 – Perfil de concentração de fármaco quando administrado por via convencional a) e quando assegurado por um sistema de libertação controlada de fármacos b). Adaptado de [7].	9
Figura 3 - Esquema ilustrativo da difusão de nanopartículas e micropartículas em tecidos com pH diferentes. Adaptado de [11].	10
Figura 4 – Estrutura cristalina do ZnO: a) Blenda de Zinco; e b) <i>Wurtzite</i> . Em preto estão representados os átomos de oxigénio e a cinza os átomos de zinco. Adaptado de [16].	13
Figura 5 - Estrutura <i>wurtzite</i> do ZnO com ilustrando a coordenação tetraédrica dos iões Zn^{2+} e O^{2-} . Adaptado de [4].	13
Figura 6 - Exemplos de nanopartículas de ZnO com diferentes morfologias: a) nanofitas [17], b) nanofios [17], c) Pontos quânticos [22] e d) nanobastonetes [23] obtidas por diferentes técnicas de síntese designadamente a) sublimação, b) método de vapor-líquido- sólido (VLS), c) hidrólise química e d) precipitação química.	14
Figura 7 – Esquema da formação de espécies reativas de oxigénio. Retirado de [24].	15
Figura 8 – Mecanismo de produção de ROS em presença de ZnO: sob radiação UV são produzidos buracos (h+) na banda de valência e eletrões (e-) na banda de condução, resultando pares e-/h+ que originam espécies reativas de oxigénio. Retirado de [23].	16
Figura 9 – Esquema ilustrativo do possível processo de transporte de DNR por nanobastonetes de ZnO para dentro de uma célula, levando à morte celular devido a produção de ROS. Adaptado de [23].	17
Figura 10 – Parâmetros que influenciam o perfil de libertação- influência do pH: a) perfil de libertação da Doxorubicina (DOX) em pontos quânticos de ZnO [28]; b) perfil de libertação da DOX em nanoaglomerados mesoporosos de ZnO [29]; c) libertação do DRN em nanobastonetes de ZnO [23]; e influência da exposição a ultrassons: d) perfil de libertação em nanoaglomerados mesoporosos de ZnO [29].	18
Figura 11 – Ilustração da formação de PU através de reação química entre um poliál (OH-R-OH) e um diisocianato (O=C=R'=C=O). Retirado de [35].	20
Figura 12 – Estruturas moleculares de ressonância do grupo isocianato. Retirado de [32].	21
Figura 13 – Degradação do PU em sistemas de libertação de fármaco a) por hidrólise do polímero de forma uniforme e visível ao longo de toda a matriz e b) por degradação superficial do polímero. Retirado de [51].	24
Figura 14 – a) Constituição de um neurónio e b) Lesão do SNC e consequente produção de fatores inibidores da regeneração deste sistema. Retirado de [55].	25
Figura 15 – Estrutura química do ibuprofeno. Retirado de [61].	27



Figura 16 – Estrutura química do: a) R (-) ibuprofeno e b) S (+) ibuprofeno. Retirado de [59].	28
Figura 17- a) Curvas de liberação do ibuprofeno em nanopartículas de sílica em meios de liberação com diferentes valores de pH e b) imagem de TEM das nanopartículas. Adaptado de [69].	29
Figura 18 – a) Estrutura molecular da gentamicina e b) constituição dos vários grupos R_1 , R_2 e R_3 que identificam os diferentes tipos de gentamicina (C_1 , C_2 , C_{1a} , C_{2a} e C_{2b}). Retirado de [71].	30
Figura 19 – a) Curva de liberação da gentamicina num cimento ósseo comercial e b) percentagem de gentamicina libertada em micropartículas de BSA com diferentes razões de BSA/G. Adaptado de [78, 79].	33
Figura 20 – Estrutura química do poliuretano <i>Tecoflex</i> ® [34].	38
Figura 21 – a) Fotografia do pulverizador utilizado na produção de NPsZnO e b) esquema ilustrativo do pulverizador.	39
Figura 22 – Representação dos dois métodos de adição da solução básica: a) método A e b) método P.	39
Figura 23 – Esquema ilustrativo do procedimento adotado para a produção de nanopartículas de ZnO.	41
Figura 24 – Esquema do processo de produção dos discos PU/NPsZnO.	43
Figura 25 – Esquema experimental adotado para a liberação de fármacos a partir das nanopartículas de ZnO.	45
Figura 26 – Classificação da IUPAC para as isotérmicas de adsorção de gases. Adaptado de [81].	47
Figura 27 – Classificação dos ciclos de histerese (processos de adsorção/dessorção irreversíveis) segundo as classificações da IUPAC. Adaptado de [81].	48
Figura 28 - Difratoograma de raios-X dos pós de ZnO adquiridos comercialmente (—ZnOC) e dos pós precipitadas (— ZnOP e — ZnOA).	57
Figura 29 – Micrografias de SEM do ZnO adquirido comercialmente (ZnOC) com diferentes ampliações.	58
Figura 30 – Micrografias de SEM das amostras de a) ZnOP e b) ZnOA com diferentes ampliações. A distância entre as setas corresponde a 42 nm.	59
Figura 31 – Isotérmicas de adsorção/dessorção dos pós de ZnOC, ZnOP e ZnOA.	60
Figura 32 – Distribuição do tamanho de poros dos pós de ZnO em análise: (—) ZnOC, (—) ZnOP e (—) ZnOA.	60
Figura 33 – Espectro de infravermelhos das amostras de (—) ZnOC, (—) ZnOP e (—) ZnOA.	63
Figura 34 – Difratoograma de raio-X do filme de Poliuretano.	64
Figura 35 – Espectro de infravermelhos do poliuretano comercial.	64



Figura 36 – ATD/TG do ibuprofeno a uma taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de árgon.	66
Figura 37 – Espectro de infravermelhos do pó de Ibuprofeno.	67
Figura 38 – Curvas de ATD/TG da Gentamicina obtidas a uma taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de árgon.	68
Figura 39 – Espectro de infravermelhos do pó de gentamicina comercial.	69
Figura 40 – Eficiência de carregamento de fármaco ao longo do tempo.	70
Figura 41 – Micrografias obtidas por SEM dos pós: a) ZnOC/Ibu, b) ZnOP/Ibu, c) ZnOA/Ibu, d) ZnOC/Genta, e) ZnOP/Genta e f) ZnOA/Genta com diferentes ampliações.	72
Figura 42 – Curva de TG a) dos pós (—) ZnOC/Ibu, (—) ZnOP/Ibu e (—) ZnOA/Ibu e b) do ibuprofeno. Os pós ZnOC são os que adsorvem maior quantidade de IBU por unidade de área (curva azul).	73
Figura 43 – Espectros de infravermelhos dos pós (—) ZnOC, (—) ZnOP e (—) ZnOA e dos pós com ibuprofeno (—) ZnOC/Ibu, (—) ZnOP/Ibu e (—) ZnOA/Ibu.	74
Figura 44 – Curva de TG dos pós de a) (—) ZnOC/Genta, (—) ZnOP/Genta e (—) ZnOA/Genta e b) de gentamicina. Os pós ZnOP são os que adsorvem maior quantidade de gentamicina por unidade de área (curva vermelha).	75
Figura 45 – Espectros de infravermelhos dos pós (—) ZnOC, (—) ZnOP e (—) ZnOA e dos pós com ibuprofeno (—) ZnOC/Genta, (—) ZnOP/Genta e (—) ZnOA/Genta.	75
Figura 46 – Micrografias de vistas de topo dos compósitos a) PU/ZnOC/Ibu, b) PU/ZnOP/Ibu, c) PU/ZnOA/Ibu, d) PU/ZnOC/Genta, e) PU/ZnOP/Genta e f) PU/ZnOA/Genta com diferentes ampliações.	77
Figura 47 - Espectro de infravermelhos dos compósitos (—) PU/ZnOC/Ibu, (—) PU/ZnOP/Ibu, (—) PU/ZnOA/Ibu, (—) PU/ZnOC/Genta, (—) PU/ZnOP/Genta, (—) PU/ZnOA/Genta e (—) PU puro....	78
Figura 48 - Perfis de libertação de ibuprofeno (% de fármaco libertado) a partir das diferentes partículas de ZnO (ZnOC, ZnOP e ZnOA).	81
Figura 49 – Perfis de libertação de ibuprofeno (% de fármaco libertado) a partir dos diferentes compósitos (PU/ZnOC, PU/ZnOP e PU/ZnOA).	82
Figura 50 - Quantidade absoluta de ibuprofeno libertado a partir de nanopartículas de ZnO e dos respectivos compósitos ao longo do tempo.	82
Figura 51 - Perfis de libertação da gentamicina (% de fármaco libertado) a partir das diferentes partículas de ZnO (ZnOC, ZnOP e ZnOA).	84
Figura 52 - Perfis de libertação da gentamicina (% de fármaco libertado) a partir dos diferentes compósitos (PU/ZnOC, PU/ZnOP e PU/ZnOA).	85
Figura 53 - Quantidade absoluta de gentamicina libertada a partir de nanopartículas de ZnO e dos respectivos compósitos ao longo do tempo.	85



- Figura 54 – Evolução da microestrutura do compósito PU/ZnOP com o tempo de liberação do ibuprofeno: após 2 dias (a), 5 dias (b), 15 dias (c) e 31 dias (d). As micrografias foram obtidas em superfícies de topo e em superfícies de corte (*secção reta*). 88
- Figura 55 - Difratoograma de raio-X dos compósitos (—) PU/ZnOC/Ibu, (—) PU/ZnOP/Ibu e (—) PU/ZnOA/Ibu depois da liberação de IBU, ao fim de 31 dias. Legenda: Δ – ZnO; \bullet – $\text{Na}_6(\text{ZnPO}_4)_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ e * – $\text{NaZn}(\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{O})$ 90
- Figura 56 - Difratoograma de raio-X dos compósitos (—) PU/ZnOC/Genta e (—) PU/ZnOP/Genta e (—) PU/ZnOA/Genta depois da liberação de gentamicina, ao fim de 31 dias. Legenda: Δ – ZnO; \bullet – $\text{Na}_6(\text{ZnPO}_4)_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ e * – $\text{NaZn}(\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{O})$ 90
- Figura 57 – Espectro de infravermelho das amostras (—) PU/ZnOC/Ibu, (—) PU/ZnOP/Ibu (—) PU/ZnOA/Ibu, (—) PU/ZnOC/Genta, (—) PU/ZnOP/Genta e (—) PU/ZnOA/Genta após liberação (ao fim de 31 dias) e do (—) PU puro..... 91
- Figura 58 – Micrografias obtidas do SEM dos compósitos: a) PU/ZnOC/Ibu, b) PU/ZnOC/Genta, c)PU/ZnOP/Ibu, d)PU/ZnOP/Genta, e)PU/ZnOP/Ibu e f)PU/ZnOA/Genta..... 93



Índice de Tabelas

Tabela 1 – Características de nanopartículas usadas para liberação de fármacos: tipo, dimensão, agente terapêutico e possível aplicação. Adaptado de [11].	11
Tabela 2 – Nanopartículas atualmente comercializadas para tratamento de cancro. Adaptado de [12].	12
Tabela 3 – Solubilidade do ibuprofeno à temperatura ambiente (25°C). Adaptado de [62].	27
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas da gentamicina	31
Tabela 5 – Materiais e reagentes utilizados com respetiva empresa fornecedora e pureza.	37
Tabela 6 – Designação das amostras preparadas	44
Tabela 7 – Condições das análises de ATD/TG realizadas aos diferentes materiais.....	51
Tabela 8 – Características dos pós de ZnO: comercial (ZnOC) e dos pós precipitados (ZnOP e ZnOA).	62
Tabela 9 – Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 33.	63
Tabela 10 – Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 35.	65
Tabela 11 – Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 37.	67
Tabela 12 – Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 39.	69
Tabela 13 – Resultados do carregamento do fármaco nos vários tipos de nanopartículas em estudo neste trabalho, após seis dias de contacto com a solução do fármaco.....	70
Tabela 14- Identificação de bandas de absorção no infravermelho observadas nos espectros apresentados na Figura 47.....	79
Tabela 15 – Observações referentes às curvas de liberação do ibuprofeno a partir de nanopartículas de ZnO e dos respetivos compósitos.	83
Tabela 16 - Observações para as curvas de liberação da gentamicina em nanopartículas de ZnO e dos respetivos compósitos.....	86
Tabela 17 - Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 57.....	91





Capítulo I





1. Introdução

1.1. Motivação

O cancro é uma doença multifatorial que deriva de uma mistura complexa de fatores genéticos e ambientais [1].

De acordo com a Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC), registaram-se, em 2008, 12,7 milhões de novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes resultantes desta doença. Segundo esta mesma agência, estima-se que até 2030 os valores de novos casos de cancro por ano dupliquem [2].

Em Portugal, no caso do sexo masculino, verifica-se uma maior incidência do cancro da próstata, do cólon e do pulmão, estando a mortalidade maioritariamente associada ao cancro do pulmão (Figura 1a). Quanto ao sexo feminino verifica-se que o cancro da mama, do cólon e do colo do útero são os que tem maior incidência, sendo o cancro da mama o que induz maior taxa de mortalidade neste grupo (Figura 1b). Estes resultados demonstram que há necessidade de inovar para se conseguirem formas de tratamento do cancro mais eficientes.

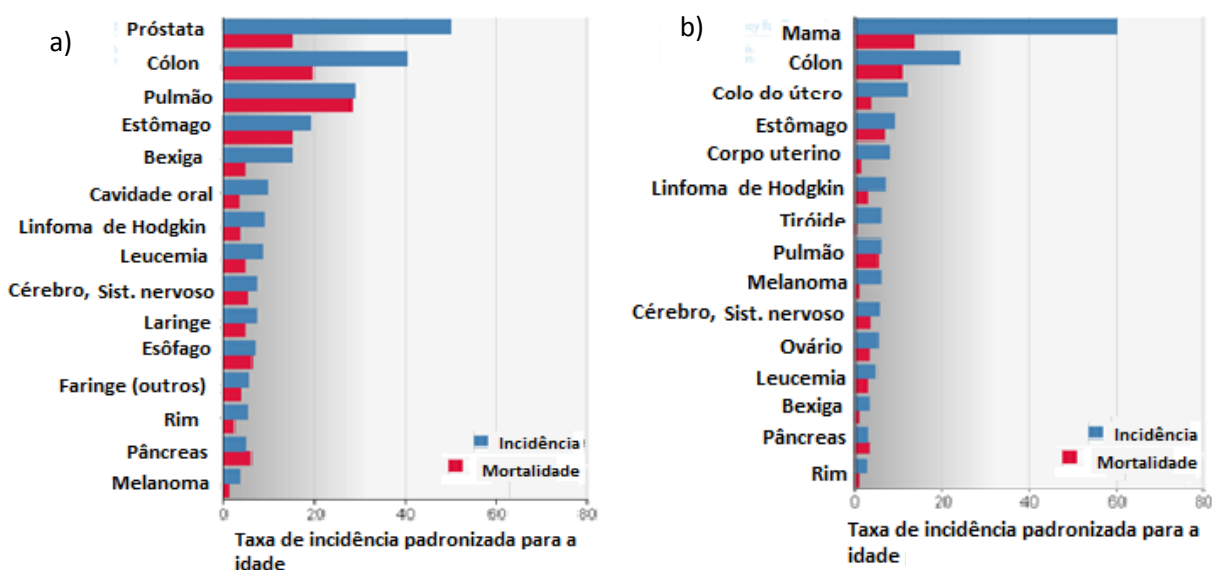


Figura 1 - Incidência e mortalidade de vários tipos de cancros a) no homem e b) na mulher. Adaptado de [2].

O sucesso das terapias anticancerígenas está associado a um diagnóstico precoce bem como a elevada eficiência terapêutica. A cirurgia, radioterapia e quimioterapia são as três principais terapias atualmente adotadas no tratamento de cancro.



No caso da quimioterapia, a mais utilizada das três terapias, muitos dos fármacos anticancerígenos possuem uma eficiência baixa devido à sua incapacidade de alcançar o local alvo em concentrações suficientes e sem causar efeitos nefastos nos tecidos e/ou células saudáveis [1]. Estes fármacos não possuem seletividade e especificidade levando à morte de células saudáveis no organismo. Existe ainda a possibilidade de se desenvolver resistência aos medicamentos levando à reincidência do cancro.

Um dos grandes desafios atuais reside no desenvolvimento de um sistema de libertação capaz de entregar o fármaco com sucesso nos alvos específicos e sem danos colaterais. Este sistema de libertação ideal, comparado com os sistemas convencionais, será altamente específico e eficiente. A produção de sistemas para libertação de fármacos que integrem materiais nanoestruturados poderá trazer vantagem significativa no uso clínico devido ao seu reduzido tamanho que permitirá assim a entrega de fármacos em sítios não acessíveis a outras escalas [3].

Estudos recentes referem os compósitos de poliuretano e nanopartículas de óxido de zinco como possíveis candidatos para sistemas de entrega de fármacos [4].

O poliuretano (PU) e o óxido de zinco (ZnO) integram a lista de materiais aprovados pela FDA sendo considerados como substâncias GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Assim, são candidatos naturais para o desenvolvimento de um sistema compósito para entrega de fármacos.

1.2. Objetivos

O presente trabalho visa dar continuidade a estudos anteriormente conduzidos na Universidade de Aveiro sob o tema “*compósitos PU/ZnO para aplicações biomédicas*” [4]. O referido estudo evidenciou que através da manipulação da razão (polímero/ nanoestruturas de ZnO) na formulação do compósito PU/ZnO se podiam direccionar os compósitos para aplicações diferentes, nomeadamente para aplicações ortopédicas e para aplicações em que se pretende travar a proliferação celular, como por exemplo no tratamento do cancro [4].

Dando continuidade à exploração das potencialidades do compósito PU/ZnO, e tendo em consideração a elevada área superficial das nanoestruturas de ZnO, pretende-se neste trabalho estudar o comportamento de compósitos PU/ZnO enquanto sistemas de libertação controlada de fármacos. Nesse contexto, o presente estudo focará a produção de nanoestruturas de ZnO com diferentes características, a sua utilização como veículos de transporte de um fármaco modelo e o seu desempenho na libertação do mesmo fármaco quer enquanto estrutura isolada quer quando incorporada numa matriz polimérica. Serão usados no presente estudo dois fármacos modelo: um anti-inflamatório - o *ibuprofeno*, e um antibiótico – a *gentamicina*.



1.3. Estrutura da dissertação

A presente dissertação é constituída por cinco capítulos:

-No Capítulo I, denominado “Introdução”, é referida a motivação e os principais objetivos que orientam o presente trabalho bem como a estrutura da respetiva dissertação.

-No Capítulo II, intitulado “Revisão bibliográfica” são referidos os desenvolvimentos mais recentes em sistemas de libertação controlada de fármacos baseados em nanopartículas de ZnO. Descrevem-se ainda as principais propriedades e bioaplicações do ZnO nanoestruturado e do poliuretano, e as características dos fármacos utilizados neste trabalho.

-No Capítulo III denominado “Procedimento Experimental”, inclui-se uma descrição detalhada do procedimento experimental seguido na síntese, preparação e caracterização dos vários materiais (partículas de ZnO e compósitos PU/ZnO), bem como do procedimento usado para o respetivo carregamento com os fármacos modelos e monitorização do perfil de libertação dos mesmos. Descrevem-se ainda as técnicas de caracterização utilizadas no presente trabalho.

-No Capítulo IV, intitulado “Resultados e Discussão” apresentam-se e discutem-se os resultados experimentais obtidos, nomeadamente os resultados referentes à caracterização dos materiais em estudo, ao carregamento dos fármacos e ao perfil de libertação dos mesmos.

-No Capítulo V, o capítulo final, intitulado “Conclusão e Trabalho Futuro”, é feita uma síntese do trabalho realizado e apresentam-se algumas sugestões para estudos futuros.





Capítulo II





2. Revisão Bibliográfica

2.1. Sistemas de libertação de fármacos

Os sistemas de libertação de fármacos existem desde os anos 30, altura em que se desenvolveram. Inicialmente estes foram pensados com o único objetivo de aumentar o nível de fármaco na corrente sanguínea [5, 6].

O objetivo da libertação controlada de fármaco é manter o agente terapêutico no local desejado por um longo período de tempo, aumentando assim a sua eficácia terapêutica, e eliminando ao mesmo tempo a sobredosagem que muitas vezes é necessário usar na administração convencional de fármacos [7]. Assim, os sistemas de libertação controlada de fármacos (SLC) devem permitir eliminar os consecutivos máximos e mínimos observados na administração por vias convencionais (Figura 2a). Esta é uma clara vantagem dos SLC face aos métodos tradicionais pois apresentam maioritariamente um comportamento semelhante ao ilustrado na Figura 2b, ou seja, inicialmente é libertada uma grande quantidade de fármaco seguido de uma diminuição da taxa de libertação até atingir um nível estável que se prolonga durante um tempo mais ou menos longo [7].

Cada fármaco possui a sua faixa de ação terapêutica, que deve situar-se abaixo da faixa considerada tóxica e acima da faixa onde o fármaco não produz qualquer efeito no organismo [5].

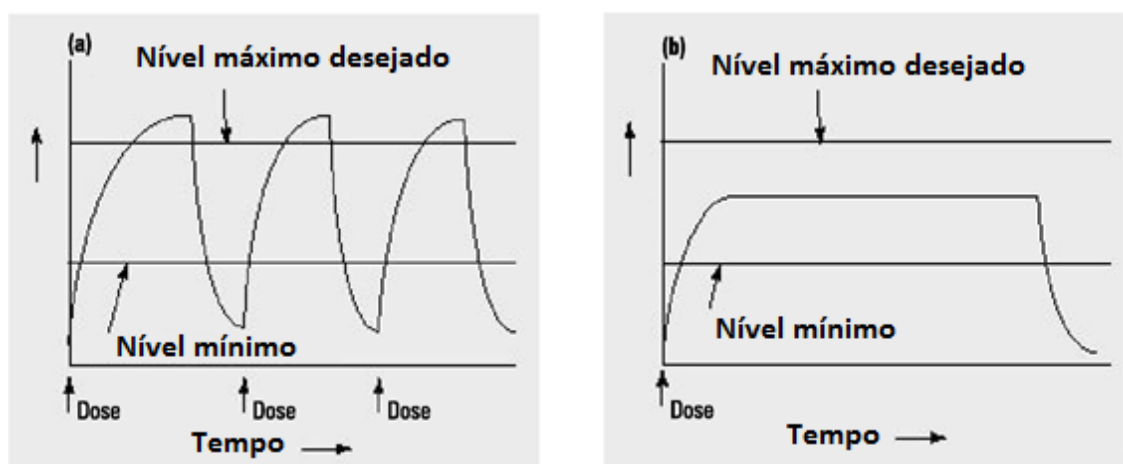


Figura 2 – Perfil de concentração de fármaco quando administrado por via convencional a) e quando assegurado por um sistema de libertação controlada de fármacos b). Adaptado de [7].

Um sistema de libertação controlada de fármaco é normalmente composto por uma matriz ou suporte, o transportador, e um fármaco, a substância ativa [8].



Para aumentar a eficiência terapêutica dos sistemas de liberação de fármacos utilizam-se, normalmente, transportadores que obedecem a alguns requisitos para poderem ser aplicados no organismo, nomeadamente: 1) devem ser não tóxicos, não cancerígenos e não provocar reações indesejadas no organismo como inflamação; 2) no caso em que o transportador é biodegradável, os produtos resultantes da degradação devem ser facilmente expelidos pelo organismo; 3) o transportador deve ser esterilizável 4) e os SLC devem apresentar um perfil de liberação adequado ao efeito pretendido [5, 9].

A utilização de transportadores com reduzidas dimensões em SLC poderá ser vantajosa devido ao facto de permitir o acesso a partes do corpo que a outra escala não seria possível. A utilização de materiais nanométricos permite a entrega de agentes terapêuticos nos núcleos celulares e possibilita a travessia da barreira hematoencefálica e a entrega do agente terapêutico de forma eficiente [10].

O reduzido tamanho das partículas nanométricas, se conjugado com a liberação de fármacos direcionados para alvos específicos, poderá acrescentar vantagens na medida em que a liberação do fármaco nos referidos locais de difícil acesso pode ser desencadeada como resposta a certos estímulos, tais como o pH e a temperatura. O pH extracelular num tumor sólido é normalmente mais ácido (6,5) do que o pH do sangue (7,4) à mesma temperatura, 37°C [11]. Neste sentido, podem usar-se sistemas nanoparticulados que sejam sensíveis ao pH para direccionar a entrega de fármacos para locais específicos (Figura 3).

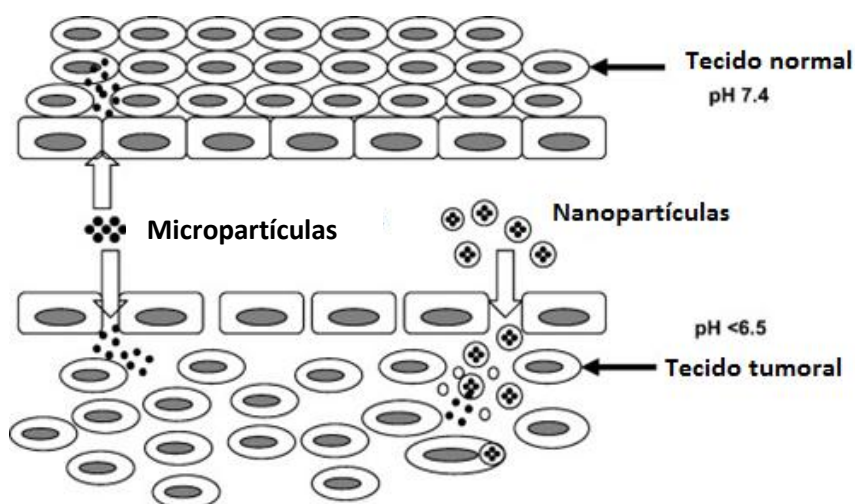


Figura 3 - Esquema ilustrativo da difusão de nanopartículas e micropartículas em tecidos com pH diferentes. Adaptado de [11].



Podem do mesmo modo ser produzidas nanopartículas que apenas libertem o agente terapêutico em sítios cuja temperatura seja superior a 37°C [11].

Nos últimos anos, a utilização de nanopartículas na libertação de fármaco em terapias anticancerígenas tem sido um foco de intensa investigação. Assim, têm sido utilizados vários tipos de nanoestruturas como transportadores, designadamente: lipossomas, micelas poliméricas, dendrímeros, colóides, pontos quânticos, entre outros. Seguidamente, na Tabela 1 estão referidos exemplos de nanopartículas utilizadas na libertação controlada de fármaco. A seleção do tipo de material é ditada pelo objetivo terapêutico final desejado e consoante o perfil de segurança do material e via de administração [11].

Tabela 1 – Características de nanopartículas usadas para libertação de fármacos: tipo, dimensão, agente terapêutico e possível aplicação. Adaptado de [11].

Material	Tamanho (nm)	Agente terapêutico	Indicação
Nanopartículas de sílica	<100	Proteínas, DNA, agentes anticancerígenos	Terapia fotodinâmica Terapia do fígado e diabetes
Nanopartículas metálicas	<50	Agentes anticancerígenos, proteínas, DNA	Terapias anticancerígenas
Micelas poliméricas	<100	Agentes anticancerígenos, proteínas, DNA	Terapias anticancerígenas, tratamento antifúngico
Lipossomas	50-100	Agentes anticancerígenos, proteínas, DNA	Terapias anticancerígenas, HIV
Dendrímeros	<10	DNA, agentes terapêuticos anticancerígenos, antibacteriais, antivirais	Terapias anticancerígenas, infeções bacterianas, HIV

Atualmente já estão no mercado farmacêutico vários destes nanomateriais, aprovados pela FDA, e que são uma alternativa à quimioterapia. Na Tabela 2 estão discriminadas algumas dessas nanopartículas e respetivo fármaco.



Tabela 2 – Nanopartículas atualmente comercializadas para tratamento de cancro. Adaptado de [12].

Produto	Tipo de nanomateriais	Indicação terapêutica
Abraxane	<i>Paclitaxel</i> - nanopartículas de Albumina	Cancro da mama e do pulmão
Myocet	DOX/lipossoma	Cancro da mama
Doxil	DOX/lipossoma	Cancro do colo do útero, múltiplos melanomas e sarcoma de <i>Kaposi</i> associado ao VIH
DaunoXome	DNR/lipossoma	Cancro
Resovist	Nanopartículas de Ferro	Imagiologia de cancro da mama

Os fármacos utilizados no carregamento de nanopartículas são muito diversos: analgésicos, antibióticos, anti-inflamatórios, proteínas, agentes quimioterapêuticos e antipiréticos, entre outros.

A adsorção do fármaco na superfície das nanopartículas é umas das metodologias frequentemente usadas para carregamento do fármaco, sendo por conseguinte uma etapa importante em estudos de libertação. Trata-se de um processo físico-químico em que as moléculas ou os iões presentes numa fase se condensam e concentram à superfície da outra fase. Existem vários fatores que podem condicionar a adsorção do fármaco, nomeadamente as características das partículas como área superficial, tamanho e distribuição de poros. Áreas superficiais elevadas favorecem uma maior adsorção. Dentro de certos limites, quanto maior o tempo de carregamento mais extensa será a adsorção [13].

O fármaco pode ser libertado por interação direta com o ambiente fisiológico: por dessorção do fármaco ligado à superfície do transportador ou, no caso de materiais poliméricos, por difusão através da matriz ou erosão da mesma [11]. Os sistemas de libertação apresentam perfis de libertação muito diversos, ou seja, tempos e quantidades de libertação de fármaco variáveis.

2.2. Óxido de zinco

O óxido de zinco (ZnO) é um óxido metálico semicondutor, do grupo II-IV, utilizado para diversos fins, sendo necessário conhecer as suas propriedades como estrutura cristalina, propriedades óticas, elétricas e magnéticas para compreender muitas das suas aplicações [14].

Este material inorgânico apresenta-se sob a forma de um pó branco praticamente insolúvel em água. Aparece na crosta terrestre na forma de um mineral denominado zincite [15].

A *wurtzite* e a blenda de zinco são duas estruturas cristalinas típicas do ZnO (Figura 4).

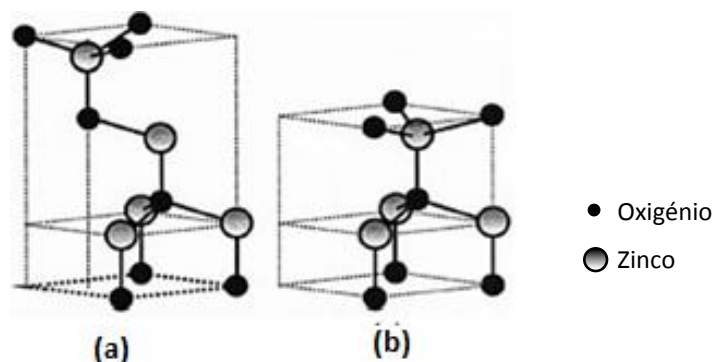


Figura 4 – Estrutura cristalina do ZnO: a) Blenda de Zinco; e b) *Wurtzite*. Em preto estão representados os átomos de oxigênio e a cinza os átomos de zinco. Adaptado de [16].

A blenda de zinco apresenta uma estrutura cúbica. A *Wurtzite* é a forma cristalina termodinamicamente mais estável do ZnO sob condições normais de pressão e temperatura. Apresenta uma célula unitária hexagonal com parâmetros de rede $a=3,25 \text{ \AA}$ e $c=5,12$, pertence ao grupo espacial $P6_3mc$ e classe cristalográfica $6mm$. Este tipo de estrutura é composto por duas sub-redes hexagonais compactas, onde as camadas ocupadas pelos átomos de zinco alternam com as camadas ocupadas por átomos de oxigênio em torno do eixo C (Figura 5). A coordenação tetraédrica dos iões Zn^{2+} e O^{2-} sugere uma estrutura não centro-simétrica, por isso o material apresenta piezoelectricidade. O efeito piezoelétrico consiste na capacidade de converter energia mecânica em energia elétrica e vice-versa, ou seja, o material adquire uma diferença de potencial elétrico sob a ação de um estímulo mecânico externo e, vice-versa, apresenta uma deformação sob a ação de um campo elétrico externo [17]. O ZnO apresenta uma densidade de $5,6 \text{ g/cm}^3$ e um ponto de fusão que ronda os 1975°C [16, 18].

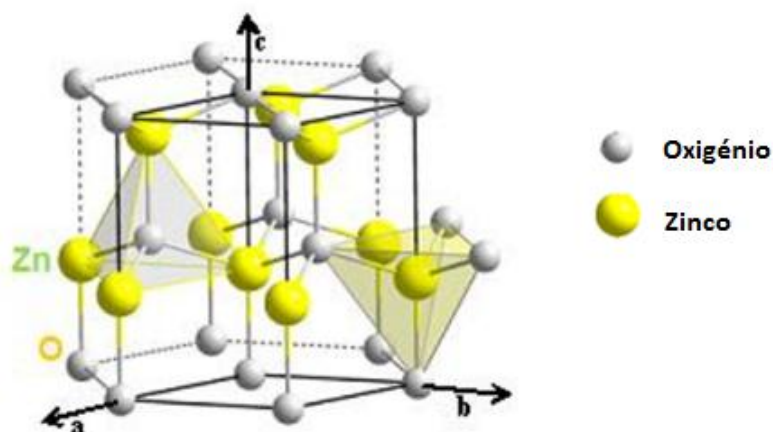


Figura 5 - Estrutura *wurtzite* do ZnO com ilustrando a coordenação tetraédrica dos iões Zn^{2+} e O^{2-} . Adaptado de [4].



A produção de ZnO com características nanométricas tem permitido demonstrar a melhoria das propriedades químicas e físicas deste material quando considerado à nanoescala. Nos últimos anos têm sido usados vários métodos para produzir nanopartículas de ZnO como o sol-gel [19], a deposição química em fase de vapor (CVD), a precipitação química [20, 21], sublimação e método de vapor-líquido- sólido (VLS) [22]. No caso do ZnO, o método de precipitação química apresenta vantagens em relação aos restantes métodos pois tem baixo custo devido ao facto da precipitação poder ter lugar a baixas temperatura (temperatura ambiente) e não exigir reagentes caros nem equipamentos sofisticados ou dispendiosos.

Várias são as morfologias de partícula de ZnO que têm sido obtidas através dos métodos anteriormente referidos, como por exemplo nanofitas, nanofios, nanofolhas, nanobastonetes, nanoflores, pontos quânticos, nanotubos, etc. [17]. Algumas destas estruturas estão ilustradas na Figura 6.

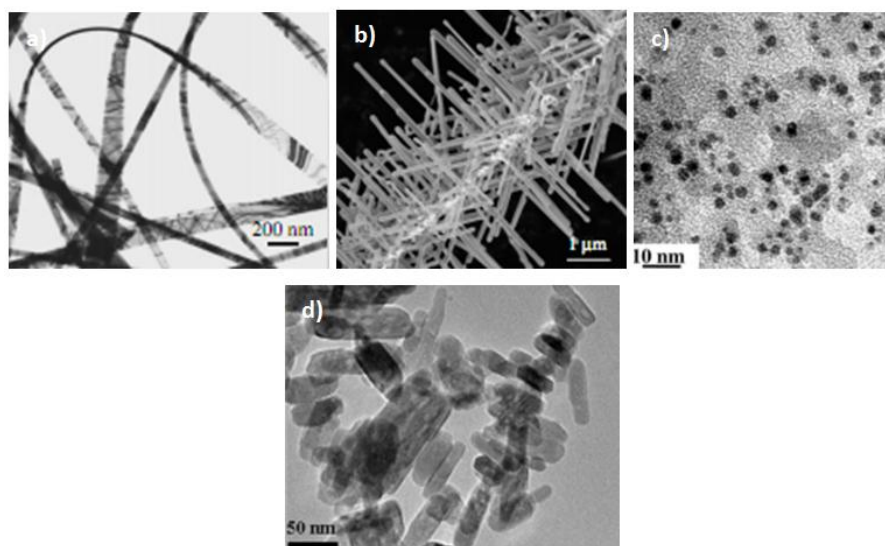


Figura 6 - Exemplos de nanopartículas de ZnO com diferentes morfologias: a) nanofitas [17], b) nanofios [17], c) Pontos quânticos [22] e d) nanobastonetes [23] obtidas por diferentes técnicas de síntese designadamente a) sublimação, b) método de vapor-líquido- sólido (VLS), c) hidrólise química e d) precipitação química.

As nanopartículas de ZnO são atualmente utilizadas na produção de tintas, corantes, produtos farmacêuticos, plásticos, borracha e produtos para eletrónica.

No campo da aplicação médica, encontra-se em fase de estudo o uso de nanopartículas de ZnO no tratamento de leucemia, tumores malignos [15] e sistemas de libertação controlada de fármacos [12].



2.2.1. Espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. São responsáveis por induzirem o *stress oxidativo*, ou seja, a perda de homeostasia celular em células vivas [24].

Entre todos os radicais livres produzidos pelo organismo as espécies reativas de oxigênio (ROS) são as mais importantes e podem ser produzidas em grande quantidade durante o *stress oxidativo* [24]. Por exemplo, o oxigênio resultante do processo de respiração poderá formar ROS. As ROS originam reações de oxidação nos componentes celulares e levam consequentemente à morte celular [12].

O oxigênio molecular é uma espécie pouco reativa. Quando entra no corpo humano pode ser transformado por processos de redução formando espécies muito reativas. Segundo *Ramarathnam et al* [24], estas reações envolvem 4 elétrons e têm como produto final a água (ver esquema ilustrativo da Figura 7). Desta transformação resultam as espécies reativas de oxigênio como o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxilo (OH^\bullet), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outras espécies reativas [24].

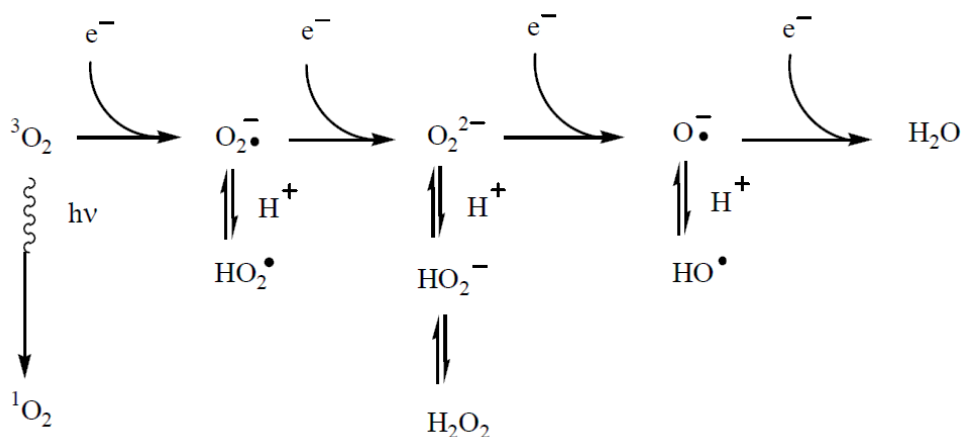


Figura 7 – Esquema da formação de espécies reativas de oxigênio. Retirado de [24].

A formação das ROS pode ser induzida por nanopartículas de ZnO. A formação das ROS está geralmente associada a defeitos cristalinos das nanopartículas de ZnO e a reações entre espécies de oxigênio adsorvidas na superfície do material e pares elétron/buraco (e^-/h^+) [23].

A produção de radicais livres também pode ser provocada por irradiação de UV. A irradiação UV vai provocar o aumento de defeitos cristalinos das nanopartículas de ZnO e



consequentemente aumentar a produção de ROS [23]. Na Figura 8 está ilustrado o mecanismo de formação de ROS em presença de nanopartículas de ZnO.

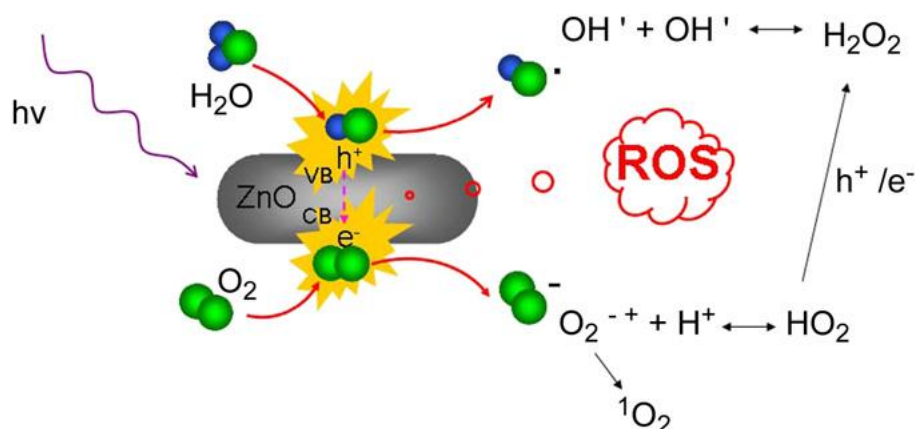


Figura 8 – Mecanismo de produção de ROS em presença de ZnO: sob radiação UV são produzidos buracos (h^+) na banda de valência e elétrons (e^-) na banda de condução, resultando pares e^-/h^+ que originam espécies reativas de oxigênio. Retirado de [23].

Estudos recentes revelam a existência de citotoxicidade das nanopartículas de ZnO em relação a determinado tipo de células, nomeadamente células cancerígenas. Por exemplo, nanopartículas de ZnO foram utilizadas com um fármaco quimioterapêutico (daunomicina) para destruição de células de leucemia. Os mecanismos de citotoxicidade das nanopartículas de ZnO não estão inteiramente esclarecidos, no entanto, a produção de ROS apresenta-se como umas das principais causas. As ROS formadas devido às nanopartículas de ZnO induziram a destruição da membrana celular contribuindo para a penetração do fármaco aumentando assim a eficiência terapêutica [25]. Os nanobastonetes de ZnO foram utilizados como transportadores de daunorubicina (DNR) para o interior das células através de processos de endocitose, nomeadamente por fagocitose [23]. Na Figura 9 apresenta-se o modelo representativo deste transporte. A morte celular resulta do processo de radiação UV nos nanobastonetes de ZnO que induzem consequentemente a formação de ROS e promovem a destruição da membrana celular por apoptose.

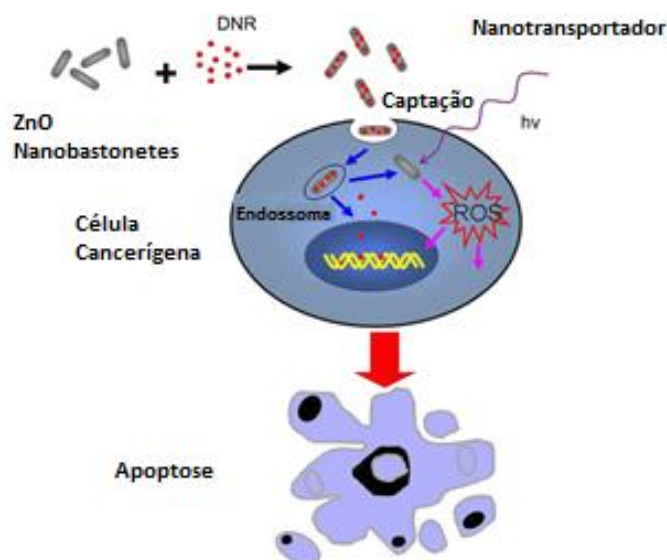


Figura 9 – Esquema ilustrativo do possível processo de transporte de DNR por nanobastonetes de ZnO para dentro de uma célula, levando à morte celular devido a produção de ROS. Adaptado de [23].

2.2.2. Nanopartículas de ZnO para liberação de fármaco

A produção de nanopartículas com o objetivo de serem utilizadas em entrega de fármacos existe há mais de 30 anos e muitas vezes tem tido como finalidade a aplicação em terapias anticancerígenas [26, 27].

A liberação de fármacos a partir de nanopartículas de ZnO é usualmente afetada pelo pH do meio de liberação. Este afeta os mecanismos de liberação do fármaco, tendo este efeito sido estudado em ensaios *in vitro* com pontos quânticos de ZnO carregados com doxorubicina (DOX) [28]. Na Figura 10a observa-se que não ocorre liberação significativa para pH=7,0 mesmo ao fim de 12h. No entanto, quando se reduz o pH para 6 e para 5 a liberação inicial do fármaco aumenta significativamente, alcançando ao fim de 2 horas o valor de 95% da quantidade de fármaco carregado para o caso de pH=5. O efeito do pH também foi estudado com nanoaglomerados mesoporosos de ZnO carregados com DOX [29]. Observou-se a liberação de 90% da DOX para uma solução tampão com pH=4 (Figura 10b) e a liberação de apenas 65% para uma solução com pH=5 (resultados obtidos ao fim de 33h).

Os nanobastonetes de ZnO carregados com Daunorubicina (DNR) [23] apresentaram resultados idênticos aos anteriores. A liberação da DNR num meio com pH de 7,4 mostrou uma taxa de liberação de apenas 19% (Figura 10c). Contudo, para menores valores de pH a taxa de



libertação revelou-se mais elevada atingindo ao fim de 36h o valor de 71% para pH=6,0 e 87% para pH=5,0.

Uma outra condição que pode influenciar significativamente a taxa de libertação é a exposição a ultrassons que foi estudada em nanoaglomerados mesoporosos carregados com doxorubicina (DOX) [29]. Neste caso verificou-se uma libertação de 26% sob a ação contínua de ultrassons (durante 30 min) e uma libertação de 42,5% sob ação intermitente (Figura 10d). Estes resultados documentam uma taxa de libertação superior quando comparados com a curva de libertação registada na ausência de ultrassons mostrando a elevada estabilidade do complexo ZnO-DOX. A utilização de ultrassons induz um aumento da libertação por potenciar mecanismos de convecção que criam condições favoráveis à difusão [29].

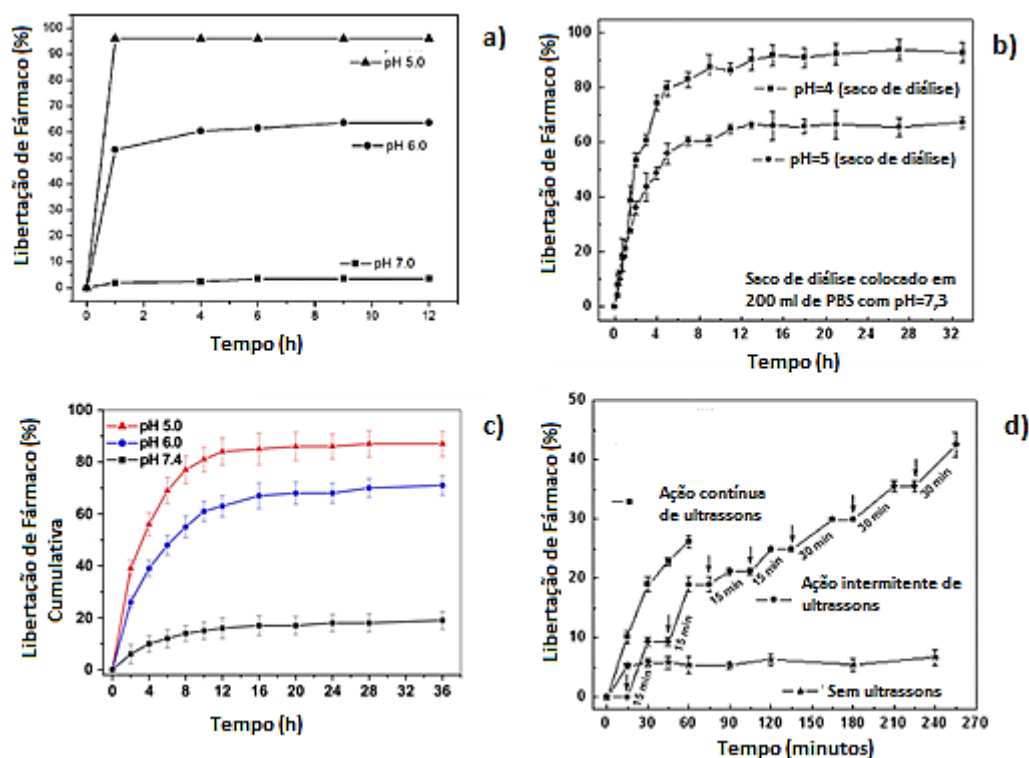


Figura 10 – Parâmetros que influenciam o perfil de libertação- influência do pH: a) perfil de libertação da Doxorubicina (DOX) em pontos quânticos de ZnO [28]; b) perfil de libertação da DOX em nanoaglomerados mesoporosos de ZnO [29]; c) libertação do DRN em nanobastonetes de ZnO [23]; e influência da exposição a ultrassons: d) perfil de libertação em nanoaglomerados mesoporosos de ZnO [29].

Em suma, as nanopartículas de ZnO, como veículos para entrega de fármacos, encontram-se associadas à utilização de agentes quimioterapêuticos nas atuais frentes de combate ao cancro. Quanto maior a razão superfície/volume maior a área superficial específica, o que poderá



proporcionar uma maior eficiência de carregamento ou seja, uma capacidade de adsorção de maior quantidade de fármaco [23]. Todavia, a eficiência de carregamento também depende da concentração de fármaco na solução utilizada na operação de carregamento. Os perfis de libertação evidenciam uma maior taxa de dessorção do fármaco a pHs mais baixos. Esta característica é desejável no tratamento do cancro uma vez que poderá ser possível estimular especificamente a libertação do fármaco em pH mais baixos. Os transportadores mostram habitualmente uma libertação muito reduzida de fármaco para pH =7,4 (pH do sangue) podendo ser introduzidos no organismo e serem utilizados para libertar o fármaco quando ocorre uma variação de pH nomeadamente pH=6,5 (pH de tumores) [23]. A maior taxa de libertação de fármaco a pHs mais baixos também pode refletir um contributo da maior solubilidade do ZnO a esses pHs o que facilita a libertação [23, 29].

2.3. Poliuretano

Os poliuretanos (PUs) são polímeros que estão presentes no nosso quotidiano devido à sua enorme versatilidade para utilizações em diversas aplicações [30]. Otto Bayer, em 1937, foi o pioneiro na síntese de PU a partir da poli adição de diisocianatos e polióis [31] Nos anos 40 o PU foi introduzido comercialmente e assume hoje em dia uma forte posição no mercado mundial, regitando-se entre 1980 e 2004 um aumento no seu consumo de 2 para 10 milhões de toneladas [32].

Atualmente os PUs podem ser aplicados em diversas áreas nomeadamente, na construção civil (isolamento térmico, elétrico e acústico), na indústria do calçado, do automóvel, nos eletrodomésticos, na indústria aeroespacial, em material desportivo e mais recentemente na área biomédica, não só em instrumentação médica como também em dispositivos biomédicos como válvulas cardíacas artificiais, em enxertos vasculares e adesivos biológicos [32, 33].

2.3.1. Química dos poliuretanos

Quimicamente, o PU é caracterizado por um grupo uretano (—NH—COO—) que pode aparecer repetido várias vezes ao longo da cadeia. Para além deste, outros grupos podem fazer parte da macromolécula deste polímero, como grupos éster, éter, ureia, amida, entre outros [34].

O PU forma-se por reação de um isocianato com um poliól tal como se ilustra, de forma esquemática, na Figura 11.

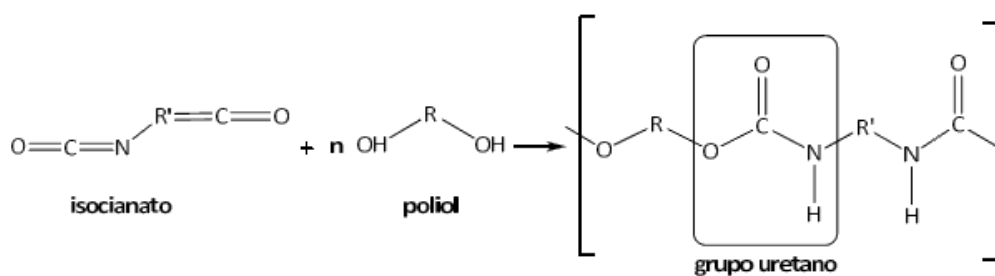


Figura 11 – Ilustração da formação de PU através de reação química entre um poliól (OH-R-OH) e um diisocianato (O=C=R'=C=O). Retirado de [35].

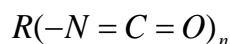
A reação direta entre um poliól e um diisocianato resulta num PU de baixa resistência mecânica. No sentido de melhorar a resistência mecânica do poliuretano utiliza-se um extensor de cadeia. O extensor de cadeia é geralmente uma pequena molécula cujos grupos terminais podem ser hidroxilo ou amina. Neste contexto, o PU pode ser representado por três componentes básicos: poliól (P), diisocianato (D) e extensor de cadeia (C) tal como se indica na seguinte fórmula [34, 36]:

$$P - (D(CD)_n - P)_n$$

O diisocianato e o extensor de cadeia irão formar o segmento rígido do polímero e o poliól o segmento flexível.

A. Isocianatos

Os isocianatos são moléculas orgânicas representadas pela seguinte fórmula:



em que R corresponde a um radical aromático ou alifático e n à funcionalidade que geralmente é igual a 2 no caso de diisocianatos ou superior no caso de poli-isocianatos [34].

Esta molécula é descrita pelas suas estruturas de ressonância (Figura 12) que são responsáveis pela sua elevada reatividade em relação a compostos como água, aminas, ácidos carboxílicos, amidas, entre outros. A estrutura química do grupo isocianato apresenta uma densidade eletrónica maior no átomo de oxigénio, intermédia no átomo de azoto e menor no átomo de carbono. Assim, o átomo de carbono pode sofrer um ataque nucleofílico de grupos com elevada densidade eletrónica [32].

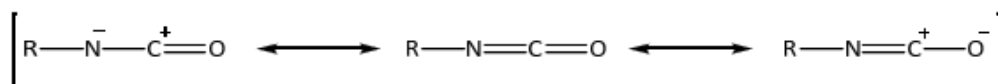


Figura 12 – Estruturas moleculares de ressonância do grupo isocianato. Retirado de [32].

A estrutura do isocianato influencia a reatividade do grupo NCO na medida em que grupos que aceitam elétrons, ligados ao grupo NCO, aumentam a sua reatividade e grupos que cedem elétrons diminuem a sua reatividade. Ou seja, os isocianatos alifáticos que não têm o grupo NCO ligado diretamente a um anel aromático são por isso menos reativos do que os isocianatos aromáticos [34].

São exemplos de isocianatos aromáticos o diisocianato de tolueno (TDI) e o 4,4' – diisocianato de difenilmetano (MDI). Entre os isocianatos alifáticos podem citar-se como exemplos o diisocianato de isoforona (IPDI), o diisocianato de metrametilxilileno (TMXDI) e o difenilmetano-diisocianato Hidrogenado (HMDI) [34].

Os isocianatos reagem com compostos que apresentam na sua constituição átomos de hidrogénio ativos, como é o caso da reação com os álcoois para formar ligações uretano. Apresentam também a capacidade de reagir com aminas formando ureias. A reação com água forma um intermediário que depois se decompõe numa amina e CO₂. Por reação com ácidos orgânicos formam uma amida e também libertam CO₂. Em determinadas condições de síntese, o grupo isocianato tem a capacidade de reagir com o grupo uretano formando alofanatos e com os grupos ureia formando biuretos [37].

B. Polióis

Os polióis são compostos que contêm mais do que dois grupos hidróxilo (OH) [32]. Os polióis formam a parte flexível do PU sendo os mais usados os polióis poliésteres (—R—COO—R'—) e os polióis poliéteres (—R—O—R') [34].

Os poliéteres obtêm-se através de reação de adição de éteres cíclicos (óxido de etileno, óxido de propileno ou tetrahidrofurano) na presença de um iniciador (etilenoglicol, propilenoglicol, glicerol, entre outros) e de um catalisador, habitualmente uma base forte. No caso dos poliésteres podem ser produzidos a partir da reação de policondensação entre ácidos dicarboxílicos e diois [32, 34].



C. Extensor de Cadeia

Os extensores de cadeia têm como função melhorar a resistência mecânica do poliuretano. Os extensores de cadeia reagem com o diisocianato formando o segmento rígido do PU. O etilenoglicol, a glicerina e o butanodiol são exemplos de álcoois e a hidrazina, etilenodiamina e a isofofonadiamina são exemplos de diaminas, todos eles usados como extensores de cadeia [34].

2.3.2. O Poliuretano como biomaterial

Atualmente o poliuretano é um polímero com aplicações no campo médico sendo considerado uma substância GRAS (*Generally Recognized as Safe*), pela FDA. Apresenta propriedades interessantes como resistência variável à biodegradação e boa compatibilidade celular e sanguínea [38]. Para fins médicos é comercializado como: *AbioCor*®, *Cardiothane*®, *Chronoflex*®, *Hemothane*®, *Mitrathane*®, *Surethane*® e *Tecoflex*® [34].

Segundo a literatura, o Poliuretano *Tecoflex*® EG80A degrada-se em PBS com pH= 7,3 a 37°C. O tempo de envelhecimento (evolução da estrutura molecular do polímero em direção ao equilíbrio termodinâmico, a qual acarreta alterações nas propriedades mecânicas ao longo do tempo) é de 180 dias e durante este período verifica-se diminuição da ductilidade, mantendo-se inalterável a resistência à tração. O *Tecoflex*® EG60D degrada-se em H₂O₂ a 25% e a uma temperatura de 100°C. O tempo de envelhecimento é de apenas um 1 dia e observa-se uma diminuição quer da ductilidade quer da resistência à tração neste período [34].

Os PUs podem ser classificados como não degradáveis, como é o caso dos aplicados em válvulas cardíacas, sacos de sangue, membranas de diálise, próteses, adesivos ósseos e *stents* e como biodegradáveis como é o caso dos utilizados em *scaffolds* para engenharia de tecidos, órgãos artificiais, fios de sutura e sistemas de libertação de fármacos [39].

Apesar de muito utilizado, o PU apresenta uma baixa estabilidade térmica e resistência mecânica. Estas propriedades podem ser melhoradas através da modificação química da sua estrutura molecular e/ou por incorporação de materiais orgânicos e inorgânicos na matriz polimérica. Alguns estudos reportaram que a incorporação de partículas nanoestruturadas de ZnO (2% p/p) numa matriz polimérica de PU melhoram significativamente o seu módulo de young e resistência à tração [40].

O PU tem sido bastante utilizado no campo da entrega de fármacos, quer individualmente quer combinado com outros materiais. Fármacos como 5-Fluorouracil [41], o *cefamandole nafate* (CEF) [42, 43], a ceftazidima [44], o acetato de dexametasona (ACT) [45, 46] e fatores de



crescimento como bFGF [47], rhBMP-2 [48] e PDGF [49] são exemplos de substâncias cuja liberação a partir de sistemas à base de PU já foi estudada. No caso do fármaco *cefamandole nafate*, o transportador usado foram nanopartículas de albumina [42]. Comparando o perfil de liberação a partir de matrizes de poliuretano carregadas com as nanopartículas com o perfil de liberação a partir das nanopartículas isoladas, concluiu-se que a matriz polimérica atua como uma barreira que retarda a difusão do fármaco e prolonga assim a sua atividade antimicrobiana até aos 8 dias [42].

Os compósitos de PU com nanopartículas de montmorilonite (silicato de alumínio) carregadas com o fármaco acetato dexametasona (ACT) são um outro exemplo da utilização de compósitos de PU em liberação de fármacos [45]. Estudou-se a liberação da ACT em dois sistemas: no PU isolado e nos compósitos de PU com nanopartículas de montmorilonite. Demonstrou-se que a taxa de liberação do fármaco na presença de nanopartículas aumentou devido ao facto destas partículas possuírem uma superfície hidrofílica que favorece a absorção de água e acelera a hidrólise do polímero. Os estudos de biocompatibilidade *in vivo* em ratos, nos dois sistemas anteriormente referidos, demonstraram uma interação interfacial adequada entre o polímero e os tecidos subcutâneos e uma liberação do fármaco que se prolongou por 14 dias [45].

Quando a degradação do PU influencia a liberação do fármaco, distinguem-se duas vias de degradação: a) hidrólise do polímero de forma uniforme e visível ao longo de toda a matriz e em que a velocidade de difusão do fluido através da matriz é superior à degradação da sua superfície (Figura 13a) e b) degradação superficial do polímero em que a taxa de liberação é proporcional à área superficial das partículas (Figura 13b), ou seja, só a parte externa da matriz é afetada [50]. A degradação em toda a matriz ocorre preferencialmente em polímeros com grande capacidade de absorção de água, como por exemplo os polissacarídeos. A degradação superficial ocorre normalmente em polímeros hidrofóbicos, que não propiciam a entrada de água no seu interior [50].

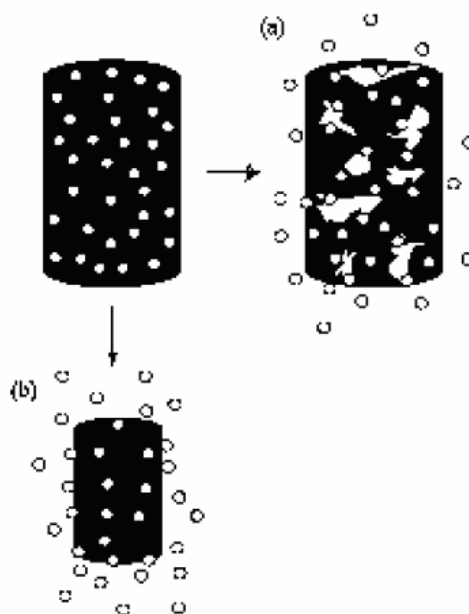


Figura 13 – Degradação do PU em sistemas de liberação de fármaco a) por hidrólise do polímero de forma uniforme e visível ao longo de toda a matriz e b) por degradação superficial do polímero. Retirado de [51].

2.4. Compósito PU/ZnO

Os compósitos são frequentemente constituídos por duas fases: uma fase contínua, denominada matriz, que envolve a denominada fase dispersa. As propriedades dos compósitos são assim determinadas pelas propriedades das fases constituintes, pelas suas proporções e pela morfologia da fase dispersa (forma, tamanho e distribuição) [52].

Para a preparação de compósitos de matriz polimérica com nanopartículas inorgânicas existem fundamentalmente três métodos: 1) Método de solução baseado na evaporação dos solventes resultantes da mistura de uma solução do polímero com uma suspensão das partículas; 2) Método de polimerização *in situ* em que as partículas inorgânicas são dispersas num monómero apropriado, sendo a polimerização induzida através de calor, radiação ou de um iniciador e 3) Método de estado fundido em que o polímero é fundido e misturado como o material de enchimento (as partículas) e posteriormente homogeneizado e conformado [53].

Os compósitos de PU/ZnO são utilizados como cateteres, em estratégias osteocondutoras e canais de células neuronais. Nos últimos anos, os compósitos de PU/ZnO têm suscitado interesse para aplicações em engenharia de tecidos, mais especificamente no campo neuronal. Estes compósitos podem diminuir a adesão e proliferação de astrócitos, um dos principais fatores que impede a regeneração do sistema nervoso central (SNC). Como qualquer outro componente, o

sistema nervoso está sujeito a sofrer lesões mais ou menos graves. Contudo, ao nível do SNC as lesões apresentam maior gravidade devido à incapacidade deste sistema de regenerar as lesões nele ocorridas, ao contrário do sistema nervoso periférico que tem a capacidade de se regenerar [54]. Quando a medula espinal (componente da SNC) é lesada, existe a possibilidade de ocorrer morte celular e rutura no axónio (Figura 14a). Esse facto poderá impedir a transmissão dos impulsos eléctricos de neurónio para neurónio. Os oligodendrócitos são as células responsáveis por produzirem a bainha de mielina no SNC. Apesar de estimularem a produção dos astrócitos, os oligodendrócitos também produzem moléculas que inibem o crescimento do axónio. Como consequência, o cérebro deixará de passar informação (de neurónio para neurónio) e irá ocorrer lesão numa determinada parte do organismo, consoante a parte lesada (Figura 14b) [54].

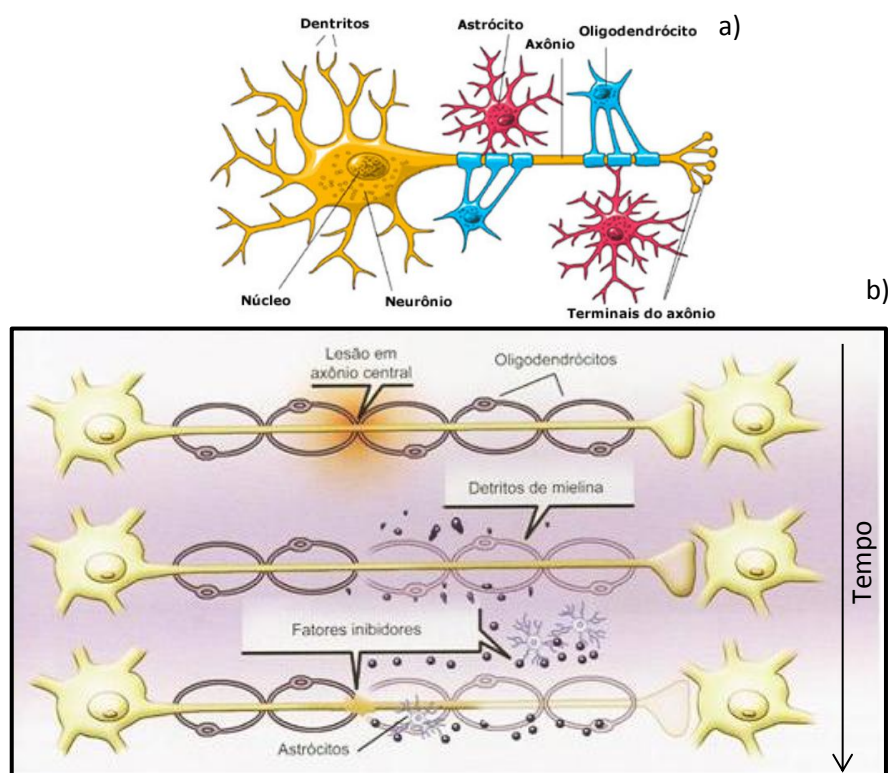


Figura 14 – a) Constituição de um neurónio e b) Lesão do SNC e consequente produção de fatores inibidores da regeneração deste sistema. Retirado de [55].

A substituição de partículas de ZnO por nanopartículas como carga da matriz polimérica induzirá mudanças nas propriedades do compósito PU/ZnO. No entanto essas mudanças estão escassamente documentadas na literatura, desconhecendo-se também as respostas biológicas que daí advenham. A piezoelectricidade do ZnO é um fator que poderá beneficiar as aplicações no campo neuronal, uma vez que a estimulação elétrica promove o desenvolvimento e proliferação



das células do SNC e consequentemente a sua regeneração. Estudos teóricos sugeriram que o ZnO apresenta maior piezoelectricidade quando produzido à nanoescala. Este estudo teórico foi mais tarde confirmado e reportado na literatura [56, 57].

Estudos recentes mostraram que é possível controlar a bioatividade e citotoxicidade dos compósitos PU/ZnO através da manipulação da concentração e/ou morfologia de partículas de ZnO [4]. Desenvolveram-se compósitos com diferentes proporções nomeadamente com 2% e 50% em peso de nanopartículas de ZnO (NPsZnO). Os ensaios de bioatividade realizados em meio fisiológico sintético revelaram que os compósitos com 50% em peso de NPsZnO são potencialmente mais bioativos que os compósitos com 2% em peso de NPsZnO. Por outro lado, os estudos de viabilidade celular revelaram que os compósitos com 2% em peso de NPsZnO apresentam maior viabilidade celular em linhas celulares MC3T3. Assim, variando a proporção de polímero e nanopartículas podem desenvolver-se compósitos para diferentes aplicações, nomeadamente para aplicações ortopédicas (compósitos com 2% em peso) e compósitos para aplicações em que se pretende travar a proliferação celular, como no tratamento do cancro (compósitos com 50% em peso) [4].

2.5. Fármaco

Nos estudos publicados sobre libertação de fármacos, os fármacos modelos mais vulgarmente referidos são a doxorubicina, a daunorubicina, o paclitaxel, o 5-flourouracil, a vancomicina, a gentamicina, a ampicilina, o ibuprofeno, o ácido acetilsalicílico, o acetato de dexametasona, e os fatores de crescimentos tais como rhBMP-2 e bFGF, etc. [58].

O ibuprofeno e a gentamicina são respetivamente um anti-inflamatório e um antibiótico. Estes foram selecionados para o estudo conduzido no presente trabalho por figurarem entre os mais comuns e mais reportados em estudos de libertação de fármacos e, por esse motivo, serão alvo de revisão nas secções que se seguem.

2.5.1. Ibuprofeno

O ibuprofeno foi sintetizado, pela primeira vez, em 1961 por Dr. *Stewart Adams* e os seus colaboradores *John Nicholson* e *Colin Burrows* no Reino Unido. Contudo, só em 1969 é que foi comercializado. Atualmente é comercializado em todo o mundo e usado no tratamento de várias doenças por milhões de consumidores [59].



Quimicamente é denominado por ácido 2-(4-isobutilfenil) propiónico, α -metil-4-(2-metil-propil fenil) acético ou 4-isobutil- α -metil-fenilacético e é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) pertencente ao subgrupo dos derivados do ácido propanóico. A fórmula empírica é $C_{13}H_{18}O_2$ (Figura 15) e a sua massa molecular é de $206,27 \text{ g mol}^{-1}$ [60].

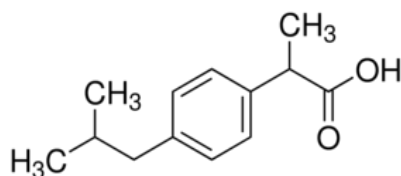


Figura 15 – Estrutura química do ibuprofeno. Retirado de [61].

Apresenta-se sob a forma de um sólido cristalino, branco, com um leve odor e sabor característico. Como indicado na Tabela 3, o ibuprofeno é praticamente insolúvel em água destilada, e bastante solúvel em acetona, etanol e octanol. A solubilidade do ibuprofeno aumenta com o pH, tendo uma constante de dissociação ácida (pKa) de 5,3 [62, 63].

Tabela 3 – Solubilidade do ibuprofeno à temperatura ambiente (25°C). Adaptado de [62].

Solvente	Solubilidade (%p/v)
Acetona	>10
Etanol	>10
Octanol	33,0
Hexano	3,3
Água destilada	<0,1

O ibuprofeno possui um carbono quiral podendo ser comercializado na forma de mistura racémica, ou seja, como mistura de 50:50 de dois enantiómeros: S (+) e R (-) (Figura 16). No organismo cerca de 40 a 60% do enantiómero R (-) é metabolicamente convertido em S (+). O enantiómero S (+) é a forma farmacologicamente mais ativa do ibuprofeno como inibidora da síntese de prostaglandina. As prostaglandinas são substâncias químicas que são produzidas pelo corpo que causam inflamação e contribuem para a sensibilidade neuronal e dor [59].

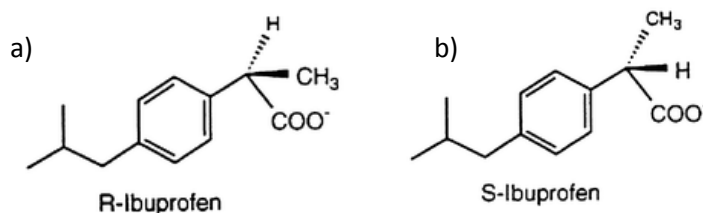


Figura 16 – Estrutura química do: a) R (-) ibuprofeno e b) S (+) ibuprofeno. Retirado de [59].

O ibuprofeno apresenta tripla função podendo ser utilizado como anti-inflamatório, antipirético e/ou analgésico. A concentração terapêutica do ibuprofeno no plasma situa-se normalmente no intervalo entre 20 a 30 mg/ml, sendo rapidamente absorvido por via oral. Uma administração oral de 400 mg corresponde a concentrações plasmáticas de 37 mg/ml [64]. Este fármaco faz parte da lista de fármacos essenciais da *Organização Mundial de Saúde* (OMS) [65]. As formas comerciais mais comuns correspondem ao *Brufen®*, *Ibuprofeno Generis®*, *Advil®*, *Nuprin®*, *Dolgesic®*, etc. [66].

O ibuprofeno está indicado no tratamento de doenças como osteoartrose, artrite reumatóide, espondilite, anquilosante, reumatismo e de situações de dor pós-traumática, dor pós-cirúrgica, odontologia, dismenorreia, cefaleias e febre [67].

Como todos os medicamentos, possui efeitos secundários que normalmente estão associados ao trato gastrointestinal e ao sistema nervoso central. Sintomas como náuseas, dor epigástrica, tonturas e eritema cutâneo podem atingir até 10% dos indivíduos medicados. O ibuprofeno é no entanto e de um modo geral bem tolerado pelo organismo [67].

O ibuprofeno apresenta um tempo de meia vida no organismo de cerca de 2h. Entende-se por tempo de meia vida o tempo ao fim do qual a quantidade inicial de fármaco no organismo é reduzida a metade. Apresenta ainda um tempo de vida no organismo de 4-6 horas [64].

Ao longo dos anos têm vindo a ser estudadas formas de prolongar a duração da ação deste fármaco, designadamente quando associado a sistemas de libertação controlada de fármacos. Por exemplo, a incorporação de *Labrafil*, um derivado do poli (etilenoglicol) (PEG), em microesferas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) modificou o perfil de libertação do fármaco ou seja, permitiu controlar a velocidade de libertação e reduziu o *burst effect* (libertação inicial rápida). A utilização de 10% de *Labrafil* com 15% de ibuprofeno, (incorporado no PLGA), atingiu concentrações terapêuticas de 8 µg/ml até 8 dias. Ao fim de 24 horas este sistema libertou 35 a 40% da carga de ibuprofeno. No caso da libertação do ibuprofeno na ausência de *Labrafil* em apenas 24 horas, alcançou-se o dobro da libertação (75-80%). Assim, a utilização de *Labrafil* funciona como uma barreira que retarda a libertação de ibuprofeno [68].



Foram também utilizadas nanopartículas de sílica mesoporosa como veículos de entrega de ibuprofeno [69, 70]. Os resultados indicaram que estas nanopartículas atingem uma eficiência de carregamento de 160 mg/g ao final de 1h, quando carregadas numa solução com uma concentração de 0,6 mg/ml de Ibuprofeno. Na Figura 17a encontra-se o perfil de libertação de fármaco exibido por este sistema. Ao fim de 1h o sistema liberta cerca de 80% de ibuprofeno, atingindo os 100% de libertação ao fim de 3h. No caso deste sistema de libertação de fármaco, verifica-se que o pH condiciona o perfil de libertação. Observa-se que para um meio neutro a libertação do fármaco é mais favorável quando comparado com os meios ácidos [69].

A eficiência do carregamento e a taxa de libertação são atribuídas à estrutura das nanopartículas de sílica (Figura 17b). Estas apresentam uma estrutura esférica, em forma de pétalas como nanofolhas, estrutura esta favorável à adsorção e libertação rápida do fármaco [69].

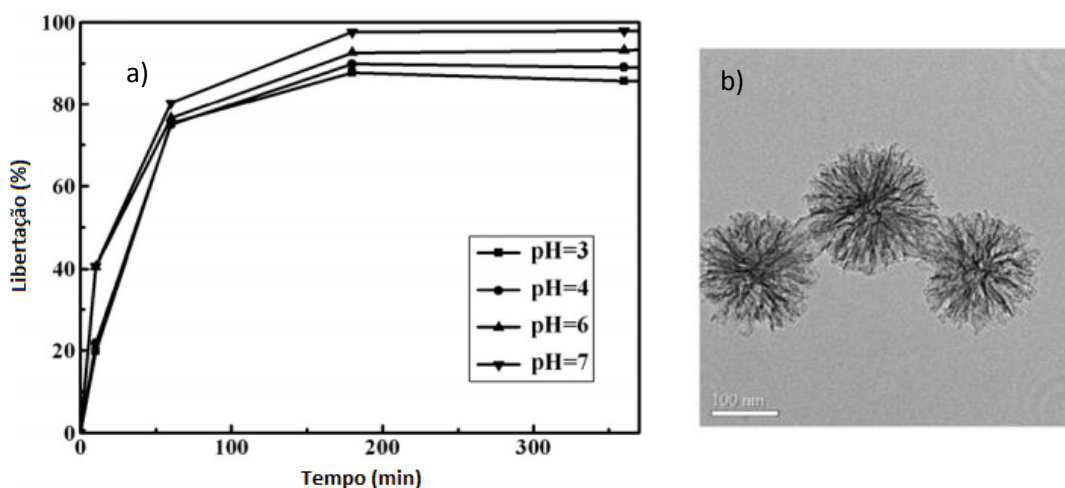


Figura 17- a) Curvas de libertação do ibuprofeno em nanopartículas de sílica em meios de libertação com diferentes valores de pH e b) imagem de TEM das nanopartículas. Adaptado de [69].

2.5.2. Gentamicina

A gentamicina pertence à classe de antibióticos comumente designados por aminoglicosídeos que possuem um amplo uso clínico no tratamento de infeções causadas por bactérias. Foi estudada em 1964, por *Weinstein* e os seus colaboradores; no entanto só um ano mais tarde foi isolada e purificada por *Rosselot* [71].

O seu princípio ativo é um complexo do grupo dos aminósidos (ou aminoglicosídeos) obtido por fermentação de *actinomycetes monospores* do género *micronospora*.



Os aminoglicosídeos consistem em 2 ou mais aminoaçúcares unidos por uma ligação glicosídica ao núcleo hexose. No caso da gentamicina, esta hexose ou aminociclitol corresponde à 2-desoxiestreptamina (Figura 18a). As famílias dos aminoglicosídeos diferenciam-se entre si pelos aminoaçúcares ligados ao aminociclitol [72].

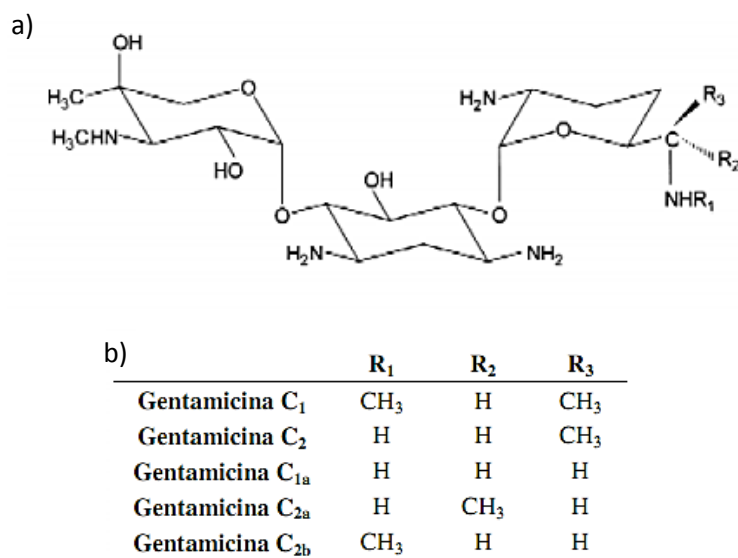


Figura 18 – a) Estrutura molecular da gentamicina e b) constituição dos vários grupos R₁, R₂ e R₃ que identificam os diferentes tipos de gentamicina (C₁, C₂, C_{1a}, C_{2a} e C_{2b}). Retirado de [71].

Comercialmente, a gentamicina consiste numa mistura de vários componentes, sendo predominantes a gentamicina C₁, C₂ e C_{1a} (Figura 18b) [73].

O mecanismo de ação da gentamicina reside na inibição da síntese proteica nas bactérias como resultado de uma ligação irreversível à subunidade ribossomal 30S. Os mecanismos de ação são iguais para os três componentes da gentamicina (C₁, C_{1a} e C₂) que possuem no entanto afinidades diferentes ao nível das ligações ribossómicas, ou seja, a gentamicina C_{1a} liga-se à subunidade 30S com uma afinidade ligeiramente superior à C₂, e C₁, por sua vez é o componente que apresenta menor afinidade [74].

A gentamicina apresenta-se como um pó com uma coloração que pode variar entre o branco e o amarelo, que é higroscópico e solúvel em água, mas moderadamente solúvel em metanol, etanol e acetona, sendo praticamente insolúvel em benzeno e hidrocarbonetos halogenados.

As principais propriedades físico-químicas da gentamicina são apresentadas na Tabela 4.



Tabela 4 – Propriedades físico-químicas da gentamicina

Propriedades	
Fórmula molecular	$C_{21}H_{43}N_5O_7$
Ponto de fusão	218-237°C
Peso molecular	477,6 g/mol
Solubilidade aquosa	100 mg/ml
pKa	13,2

Em Portugal, os nomes mais comuns sob os quais a gentamicina é comercializada são: *Gentamicina Braun*®, *Gentamicina Inject*®, *Genta-Gobens*®, *Rigaminol*® e *Garalone*®. O antibiótico gentamicina está indicado para o tratamento de infeções por germes sensíveis, infeções ao nível renal, genital, urinário, e para o tratamento de meningites, problemas respiratórios, cutâneos e articulares [73].

As aminoglicosídeos são fracamente absorvidos quando administrados por via oral (menos de 1% é absorvido). Por esse motivo são administrados de forma injetável, por via intramuscular ou intravenosa [72]. Em termos de propriedades farmacocinéticas, para um volume de 0,22-0,3 Kg/L o tempo de semivida de eliminação corresponde a 2-2,5 horas para um adulto com função renal normal, sendo de aproximadamente 3h nos lactentes e de 5 horas nos recém-nascidos. A eliminação ocorre através dos rins, através da filtração glomerular, com uma depuração de cerca de 66% [72, 75].

Estabeleceu-se que as concentrações terapêuticas da gentamicina correspondem a valores de 5-10 µg/ml. Concentrações superiores a 10 µg/ml podem ser prejudiciais, causando mesmo efeitos nefrotóxicos que podem levar ao desenvolvimento de insuficiência renal [72]. Assim, a dose terapêutica e a dose tóxica encontram-se muito próximas, conferindo a este fármaco, um baixo índice terapêutico (faixa de ação terapêutica que deve situar-se abaixo da faixa considerada tóxica e acima da faixa onde o fármaco não produz qualquer efeito para o organismo [5]).

A nefrotoxicidade decorre da acumulação da gentamicina nas células tubulares proximais, verificando-se ser quase sempre reversível, devido à capacidade de regeneração das mesmas. O maior problema da nefrotoxicidade está relacionado com a redução da excreção do fármaco, que leva consequentemente ao desenvolvimento de ototoxicidade, ou seja, compromete a função auditiva e/ou do sistema vestibular periférico. O grupo amina é responsável pela toxicidade dos aminoglicosídeos, de modo que quanto maior o número de aminas maior a toxicidade do antibiótico [72].



No sentido de minimizar os efeitos tóxicos da gentamicina referidos anteriormente, têm sido utilizados vários materiais para prolongar a ação deste antibiótico no organismo ou seja, diminuir a quantidade de fármaco libertado inicialmente e prolongar a sua ação durante um certo período de tempo. Foram por exemplo utilizados como veículos para entrega de fármacos materiais como o poliéster poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) com compostos bioativos como a hidroxiapatite e a *wollastonite* (CaSiO_3). As microesferas de PHBV/hidroxiapatite recomendam-se quando o objetivo é libertar o fármaco durante um longo período de tempo pois evidenciaram uma libertação sustentada ao longo de 10 semanas [76]. As microesferas de PHBV/*wollastonite* foram utilizadas para reparação óssea e libertaram 90% da gentamicina em 22 dias [77].

Os cimentos ósseos associados a antibióticos são normalmente utilizados em cirurgias ortopédicas para proporcionar elevadas concentrações de antibiótico no local [78]. Na Figura 19a apresenta-se o perfil de libertação da gentamicina a partir do cimento ósseo comercial (CMW1®). Grande parte da gentamicina é libertada nas primeiras horas e mantém-se constante posteriormente. A libertação inicial brusca deve-se ao facto do fármaco estar adsorvido à superfície do cimento e difundir rapidamente a partir daí. Este sistema comercial reteve mais de 90% da quantidade de fármaco na matriz [78]. Um outro estudo em que se utilizaram micropartículas de albumina de soro bovino (BSA) carregadas com gentamicina (G), usando diferentes razões (BSA/G), evidenciou os perfis de libertação que se apresentam na Figura 19b [79]. A libertação da gentamicina neste sistema é rápida nas primeiras seis horas, apresentando seguidamente valores de 30 e 75% para sistemas razões (BSA/G) de 8:1 e 1:1, respetivamente. Esta libertação inicial rápida é explicada pela localização do fármaco perto da superfície das micropartículas que permite a sua fácil libertação antes do *swelling* (inchamento) da BSA. Dispor-se de uma elevada taxa de libertação do antibiótico no início da terapia é importante pelo facto de a eficiência do antibiótico estar dependente da concentração de fármaco no local da infeção no início da terapia [79].

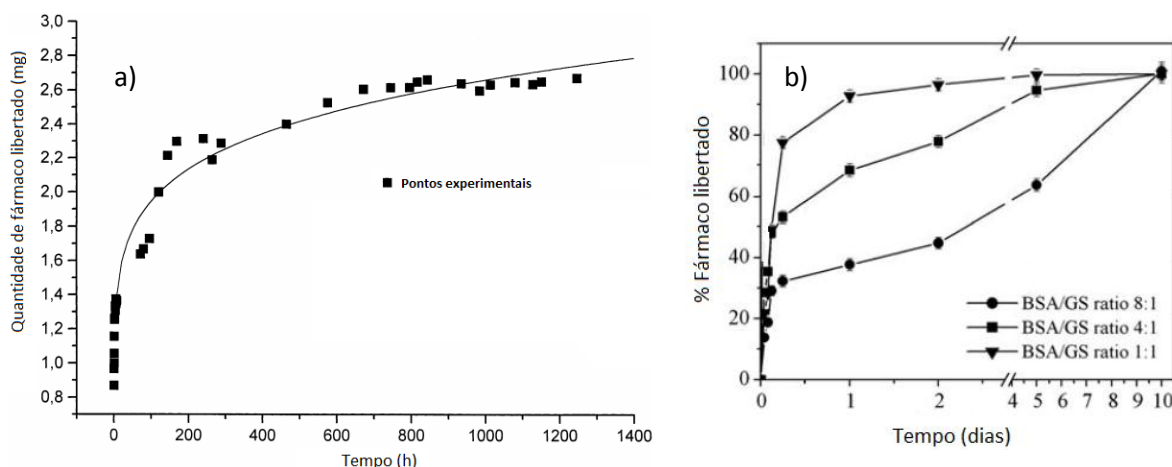


Figura 19 – a) Curva de libertação da gentamicina num cimento ósseo comercial e b) percentagem de gentamicina libertada em micropartículas de BSA com diferentes razões de BSA/G. Adaptado de [78, 79].

Em suma, verifica-se que os perfis de libertação dos fármacos em análise, o ibuprofeno e a gentamicina, são influenciados pelo efeito sinérgico do fármaco e do material utilizado na sua libertação. Por exemplo, estruturas porosas e esféricas permitem uma libertação mais rápida de fármacos e a razão fármaco/materiais poderá influenciar o seu perfil de libertação. Por outro lado há que atender a variáveis externas como o pH e as condições de agitação do meio cujo efeito no perfil de libertação destes e doutros fármacos, se revelou significativo.

Assim, no sentido de desenvolver um sistema capaz de minimizar os riscos de toxicidade do fármaco pela via da minimização da dose de fármaco necessária para se atingir o efeito terapêutico desejado é necessário ter em consideração os aspetos associados à própria formulação do sistema bem como às condições locais que presidirão à libertação do fármaco.





Capítulo III





3. Procedimento Experimental

Neste capítulo descrevem-se os procedimentos e as técnicas usadas para a execução da parte experimental deste trabalho. Nas primeiras secções serão referidos os materiais e reagentes utilizados ao longo de todo o trabalho e os procedimentos usados para a síntese de nanopartículas de ZnO e produção de compósitos de PU/ZnO. Na secção seguinte refere-se o procedimento experimental escolhido para realizar o carregamento dos fármacos e a sua libertação. Finalmente serão apresentadas as várias técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho de investigação.

3.1. Materiais e reagentes utilizados

Os materiais estudados neste trabalho foram produzidos por técnicas de preparação em que foram utilizados os vários materiais e reagentes referidos na Tabela 5. São também referenciados a empresa fornecedora e o respetivo grau de pureza.

Tabela 5 – Materiais e reagentes utilizados com respetiva empresa fornecedora e pureza.

Reagente/Materiais	Fórmula Química	Empresa Fornecedora	Pureza
1,2 – Dicloroetano	$C_2H_4Cl_2$	Fluka	$\geq 99,5\%$
2 – mercaptoetanol	C_2H_6OS	Sigma	—
2 – Propanol	C_3H_8O	Fluka	$> 99,8\%$
(S)-(+)-Ibuprofeno	$C_{13}H_{18}O_2$	Aldrich	99%
Ácido cítrico monohidratado	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Sigma - Aldrich	99,5 – 102%
Ácido etilenodiamino tetra-acético	$[CH_2N(CH_2COOH)_2]_2$	BDH	98 %
Bicarbonato de Sódio	$NaHCO_3$	Sigma - Aldrich	$\geq 99,7 \%$
Borax Decahidratado	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	Sigma - Aldrich	$\geq 99,5\%$
Cloreto de Zinco	$ZnCl_2$	Merck	$\geq 98\%$
Clorofórmio	$CHCl_3$	Carlo Erba	$\geq 99\%$
Etanol	C_2H_5OH	Carlo Erba	$\geq 99,9\%$
Hidróxido de Sódio	$NaOH$	Sigma - Aldrich	$\geq 98\%$
Metanol	CH_3OH	Sigma - Aldrich	$\geq 99,8\%$
Nanopartículas Comerciais de Óxido de Zinco	ZnO	Aldrich	—
O—ftalaldeído	$C_8H_6O_2$	Fluka	$\geq 97\%$



Poliuretano	PU	Fluka	—
Solução Tampão Salina ¹	—	Sigma	—
Sulfato de Gentamicina	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	Sigma	—

¹PBS a 0,01M contém NaCl 0,138M e KCl 0,0027M, com um pH de 7,4 a 25°C

As nanopartículas comerciais de ZnO (Aldrich) usadas no presente trabalho apresentam um tamanho médio inferior a 100 nm, de acordo com as especificações do fornecedor. O poliuretano comercial (Tabela 5) corresponde ao produto *Tecoflex*[®] que é adequado para aplicações médicas (*medical grade*).

O *Tecoflex*[®] comercial (Figura 20) corresponde a um poliuretano obtido através da mistura de um difenilmetano-diisocianato hidrogenado (HMDI), o éter glicol de politetrametileno (PTMEG) e o 1,4- butanodiol (BDO) [35]. O *Tecoflex*[®] apresenta uma dureza de 72A (Shore A), uma densidade de 1,14g/cm³ e uma temperatura de fusão situada entre 150 e 190°C.

O ZnO e o poliuretano são ambos aprovados pela FDA.

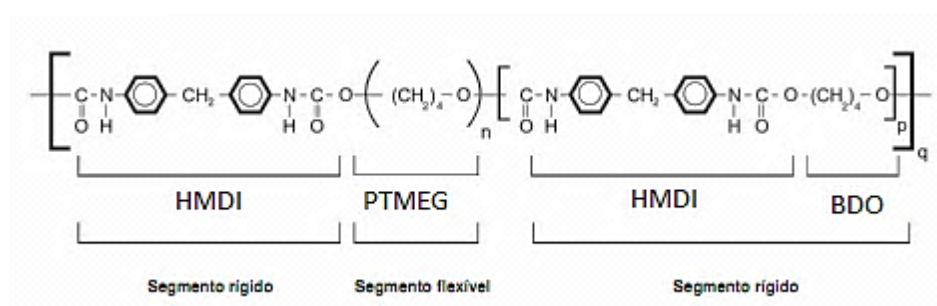


Figura 20 – Estrutura química do poliuretano *Tecoflex*[®] [34].

3.2. Síntese de pós de ZnO

As nanopartículas de ZnO foram preparadas por precipitação química à temperatura ambiente como descrito na literatura [4].

A precipitação de ZnO consiste essencialmente em adicionar uma solução de um sal de zinco com uma solução de uma base por forma a assegurar um pH final superior a 12. Nestas condições e sob concentração apropriada dos reagentes precipita diretamente óxido de zinco em solução.

Neste trabalho foram utilizadas duas variantes do método de precipitação química que deram origem a dois tipos diferentes de partículas de ZnO. A diferença fundamental entre os dois procedimentos deriva da forma de adição de reagentes: num dos casos (método A) a adição das soluções básicas efetuou-se com auxílio de uma bureta e no outro caso (método P) com um pulverizador. O caudal de adição corresponde a 28,1 ml/min no caso da bureta, e de 41,6 ml/min



do caso do pulverizador. Na Figura 21 encontra-se esquematizado o pulverizador utilizado, que é constituído por duas entradas, uma superior em que se adiciona a solução que se pretende pulverizar e outra lateral onde é admitido ar comprimido a uma pressão de 4bar. Quando a solução entra em contato com o ar provoca-se a sua dispersão e a formação de pequenas gotículas.

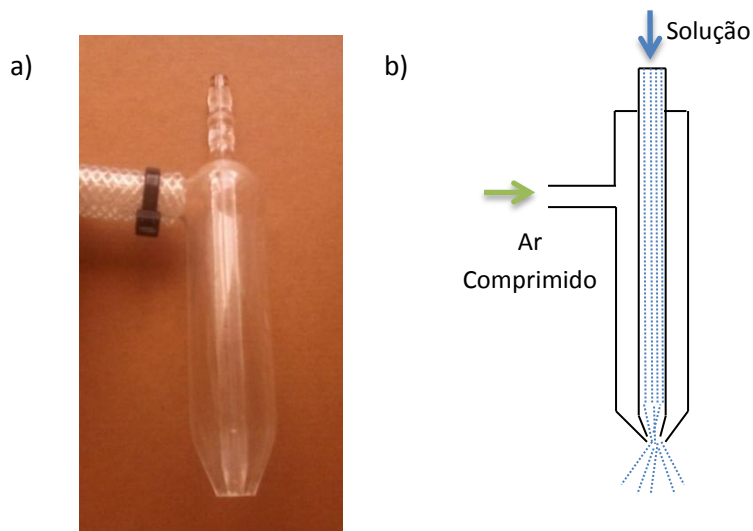
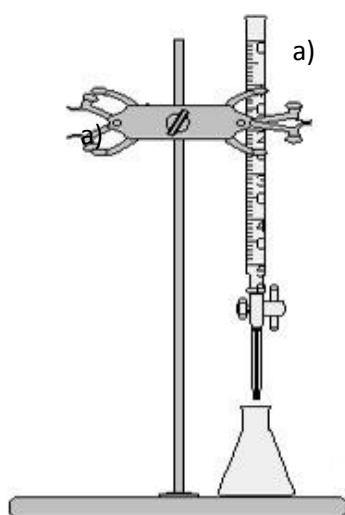


Figura 21 – a) Fotografia do pulverizador utilizado na produção de NPsZnO e b) esquema ilustrativo do pulverizador.

A Figura 22 pretende ilustrar as montagens efetuadas neste trabalho para a precipitação de pós de ZnO.



Método A: Bureta



Método P: Pulverizador

Figura 22 – Representação dos dois métodos de adição da solução básica: a) método A e b) método P.



Para a síntese da solução ácida contendo os iões precursores dos precipitados de ZnO usaram-se como reagentes o cloreto de zinco (ZnCl_2), ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) e hidróxido de sódio (NaCl). Procedeu-se a dissolução do ácido cítrico com ZnCl_2 (Cit/ZnCl_2) em 25 ml de água desionizada através de agitação magnética (100 rpm) durante 20 minutos. Ao fim do tempo estipulado a solução apresenta-se totalmente translúcida. Utilizou-se uma razão molar de 3:1 de Cit/ZnCl_2 no sentido de assegurar a complexação dos iões Zn^{2+} . A solução final de Zn^{2+} apresentou um pH de 1 e uma concentração de iões Zn de 1,89 mmol/ml.

A produção de nanopartículas de ZnO assenta na adição de uma solução básica de NaOH a uma solução ácida do catião Zn^{2+} como a anteriormente descrita. Numa primeira etapa adicionou-se uma solução etanólica de NaOH [43% (v/v) de etanol] à solução ácida de Zn^{2+} . Seguidamente, à solução resultante, adicionaram-se 15 ml de NaOH obtendo-se um precipitado branco. O sistema foi mantido sob constante agitação magnética (100 rpm) e a solução final, em ambos os casos, apresentou um pH de 13,5.

O precipitado branco obtido foi submetido a centrifugação (*Beckman L8-70M Ultracentrifuge*) a 10000 rpm durante 15 minutos. O depósito resultante da centrifugação foi lavado 12 vezes com água desionizada, assegurando-se uma concentração de Na^+ na última lavagem de ~ 1 ppm (Figura A1). Posteriormente o pó foi seco numa estufa a 80°C durante 24h.

Na Figura 23 encontra-se esquematizada a produção dos pós de ZnO pelo método de precipitação química.

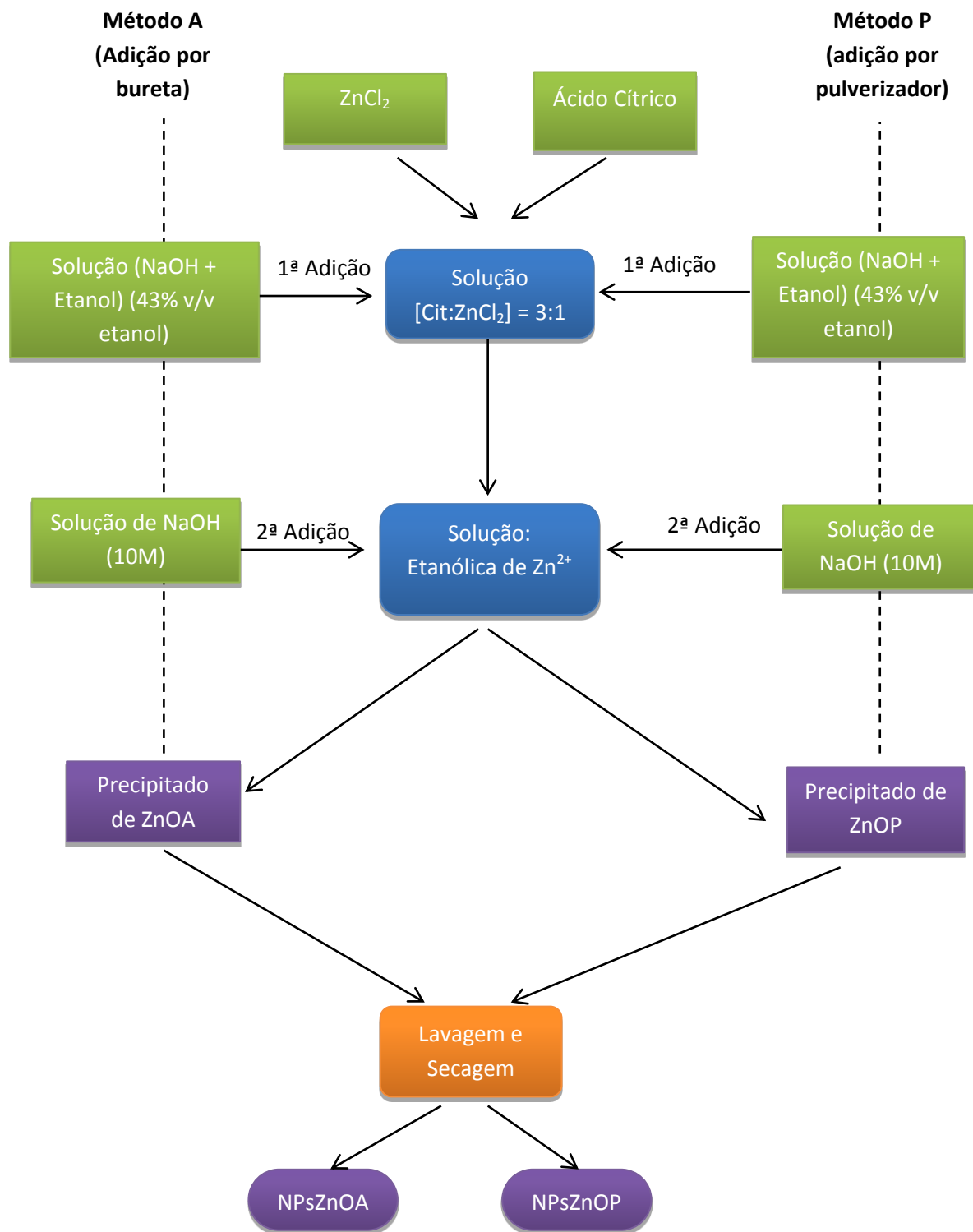


Figura 23 – Esquema ilustrativo do procedimento adotado para a produção de nanopartículas de ZnO.



Os pós produzidos pelo método A (NPsZnOA) e pelo método P (NPsZnOP) bem como o pó comercial (NPsZnOC) foram analisados por difração de raios-X (DRX), isotérmicas de *Braunauer-Emmett-Teller* (BET), microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

3.3. Carregamento das nanopartículas com fármaco

Neste trabalho estudou-se o carregamento com fármaco das nanopartículas ZnO comerciais e das nanopartículas produzidas pelo método de precipitação química. Utilizaram-se dois fármacos: o ibuprofeno e a gentamicina. O método de carregamento usado foi idêntico para ambos os fármacos e consistiu nos seguintes passos: num copo de vidro tapado, adicionaram-se 1 g de nanopartículas de ZnO a 50 ml de solução de fármaco (400 µg/ml, solvente água desionizada), deixando-se repousar a suspensão resultante durante tempos pré determinados: 2h, 1 dia, 2 dias e 6 dias. Seguidamente separou-se a solução de fármaco sobrenadante por ultracentrifugação a 10000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente procedeu-se à lavagem do depósito resultante da ultracentrifugação. Analisaram-se por espectrofotometria de UV todas as soluções, isto é, solução sobrenadante e solução de lavagem, para quantificar o fármaco adsorvido pelas nanopartículas de ZnO.

Os espectros de ibuprofeno e gentamicina foram obtidos através de várias soluções de PBS com diferentes concentrações de fármaco de modo a determinar o pico de absorvância correspondente a cada fármaco. Assim, as análises foram conduzidas no comprimento de onda de 264 nm para o ibuprofeno e de 332 nm para a gentamicina. Para quantificar os fármacos estabeleceu-se a correspondência entre a absorvância dos fármacos, no comprimento de onda respetivo, e a concentração de fármaco em solução, permitindo assim traçar curvas de calibração usando soluções aquosas de fármaco de concentração conhecida.

A quantidade de fármaco adsorvido considerou-se ser a diferença entre a inicial e o somatório das quantidades de fármaco encontradas na solução (sobrenadante inicial e resultante das várias lavagens). Estes valores permitiram obter a eficiência de carregamento, calculada como a razão percentual entre a quantidade de fármaco adsorvida e a quantidade disponibilizada de fármaco na solução inicial. A quantidade de fármaco efetivamente carregado nas nanopartículas também pode ser expressa em quantidade de fármaco por nanopartícula (mg/mg). O depósito constituído pelas partículas após carregamento foi colocado no exsiccador, para posteriores análises de SEM, TG e FTIR.



3.4. Produção dos compósitos PU/ZnO

Neste trabalho, produziram-se compósitos de poliuretano/nanopartículas de ZnO com diferentes características e foi utilizada em todos eles uma razão mássica de ZnO de 50% (massa de ZnO/massa total do compósito). As nanopartículas utilizadas na produção dos compósitos foram previamente carregadas com ibuprofeno e gentamicina (secção 3.3).

Os compósitos foram produzidos pelo método de evaporação de solvente, tal como descrito na literatura [4]. Para tal, procedeu-se à dissolução de PU em clorofórmio (2,47% wt de PU) sob agitação magnética (200 rpm). Preparou-se também uma suspensão de nanopartículas de ZnO em 1,2 – dicloroetano (5,65% wt de ZnO) com o auxílio de ultrassons durante 5 minutos. A solução de PU e de ZnO resultantes foram misturadas num copo de vidro de 10ml e submetidas a ultrassons por mais 10 minutos. Levou-se a mistura final a uma estufa a 37°C, durante 24 horas para promover a evaporação dos solventes, obtendo-se assim discos de compósitos de PU/NPsZnO. Na Figura 24 encontra-se esquematizado o procedimento experimental adotado para produção dos compósitos de PU/NPsZnO.

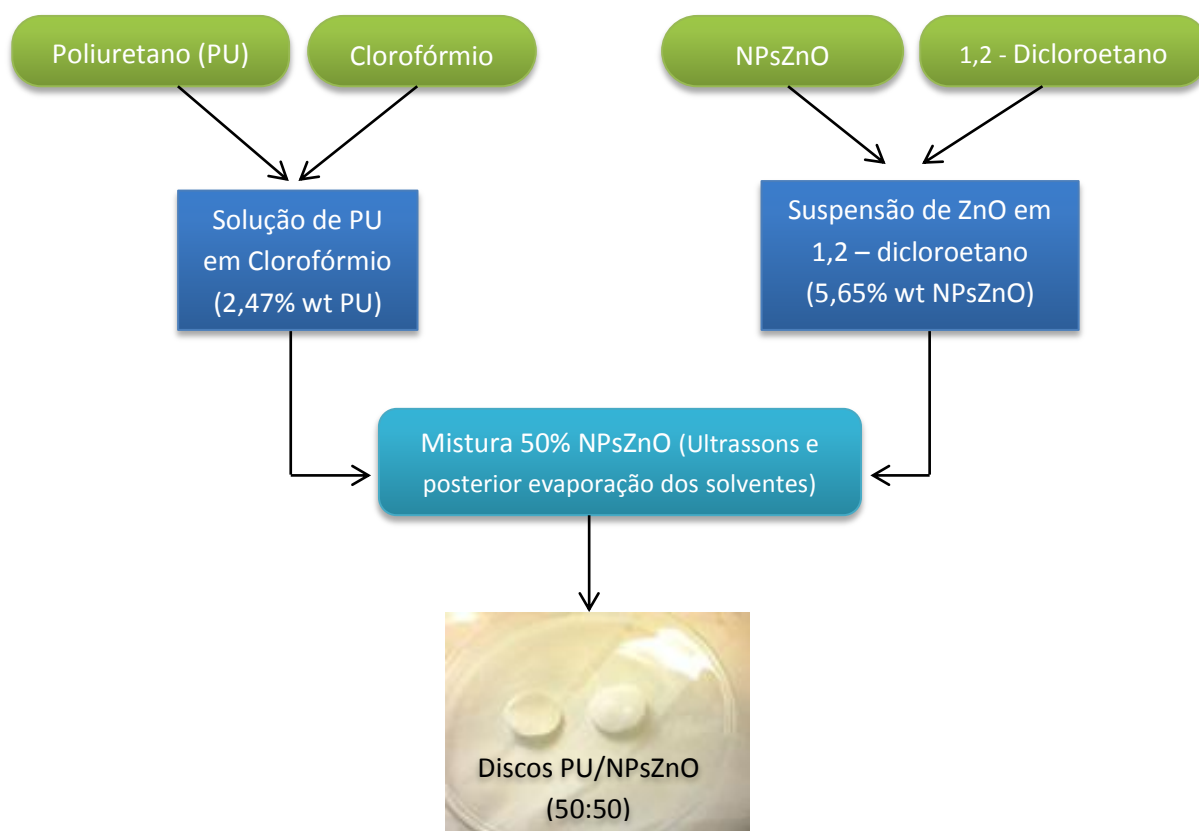


Figura 24 – Esquema do processo de produção dos discos PU/NPsZnO.



Para termo de comparação, produziram-se filmes de poliuretano comercial puro. Para tal procedeu-se à dissolução de PU em clorofórmio (2,47% wt PU) sob agitação magnética. Esta solução de PU foi transferida para um copo de vidro de 10ml, submetida a ultrassons durante 10 min e, posteriormente colocado na estufa a 37°C, durante 24h.

3.5. Ensaios de libertação *in vitro*

Neste trabalho experimental realizaram-se estudos de libertação dos fármacos ibuprofeno e gentamicina em dois sistemas, nanopartículas de ZnO e compósitos de PU/ZnO, no sentido de avaliar o perfil de libertação dos fármacos escolhidos. Na Tabela 6 resumem-se as designações das amostras preparadas com referência ao tipo de nanopartículas de ZnO usadas e ao tipo de fármaco carregado.

Tabela 6 – Designação das amostras preparadas

	Sistemas carregados	Carregamento com Ibuprofeno	Carregamento com gentamicina
Nanoestruturas	NPsZnOC	NPsZnOC/Ibu	NPsZnOC/Genta
	NPsZnOP	NPsZnOP/Ibu	NPsZnOP/Genta
	NPsZnOA	NPsZnOA/Ibu	NPsZnOA/Genta
Compósitos	PU/NPsZnOC	PU/NPsZnOC/Ibu	PU/NPsZnOC/Genta
	PU/NPsZnOP	PU/NPsZnOP/Ibu	PU/NPsZnOP/Genta
	PU/NPsZnOA	PU/NPsZnOA/Ibu	PU/NPsZnOA/Genta

3.5.1. Libertação dos fármacos a partir das NPsZnO

Para os estudos de libertação *in vitro* dos fármacos adsorvidos nas nanopartículas de ZnO (secção 3.3) utilizou-se uma membrana de diálise (12-14000 Daltons, *Medicell International Ltd*). Transferiram-se 10 mg de nanopartículas de ZnO carregadas para uma membrana de diálise contendo 5 ml de PBS a pH=7,4. Colocou-se esta membrana num recipiente com 200 ml de PBS a pH=7,4 (Figura 25). Transferiu-se este sistema para uma estufa (*Edmund Buhler Th15*) a 37°C e sob agitação a 125 rpm. Removeram-se periodicamente amostras de solução (3 ml) com



reposição de igual volume de PBS fresco. As amostras foram filtradas através de uma membrana com tamanho de poro de 0,22 μm . A quantidade de fármaco (ibuprofeno ou gentamicina) libertado para a solução foi avaliada por espectrofotometria de UV. Utilizou-se um comprimento de onda de 264 nm no caso do ibuprofeno e de 332 nm no caso da gentamicina

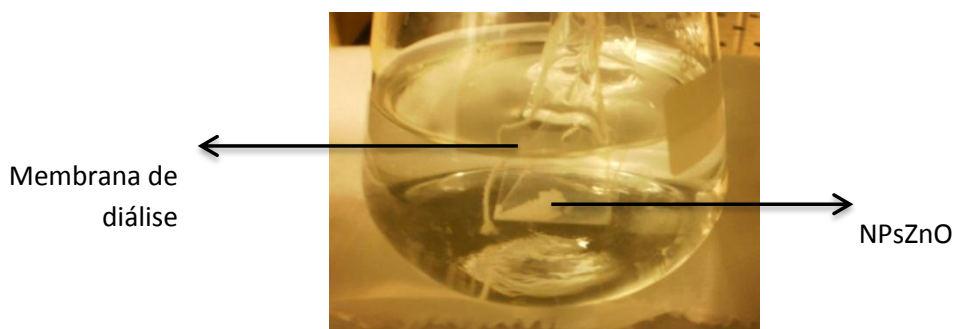


Figura 25 – Esquema experimental adotado para a libertação de fármacos a partir das nanopartículas de ZnO.

As membranas de diálise necessitam de um pré-tratamento para serem utilizadas como dispositivo para estudos *in vitro* de libertação de fármaco. Dada a fragilidade do saco de diálise o produto comercial contém glicerina, que funciona como protetor da membrana, e que é necessário remover antes da sua utilização nos ensaios de libertação. A limpeza foi efetuada de acordo com a referência [80], aquecendo a membrana a 80°C durante 30 minutos numa grande quantidade de solução aquosa (800ml) com 2% de bicarbonato de sódio e 1 milimolar de EDTA [80].

3.5.2. Libertação dos fármacos a partir dos compósitos de PU/ZnO

Colocou-se o compósito, previamente pesado, em 200 ml de PBS a pH=7,4 e transferiu-se o conjunto para uma estufa a 37°C sob agitação a 125 rpm. Removeram-se periodicamente amostras da solução (3 ml), com reposição por igual volume de PBS fresco. As amostras foram filtradas através de uma membrana de 0,22 μm . A quantidade de fármaco (ibuprofeno ou gentamicina) libertada a partir dos compósitos para a solução foi avaliada através de espectrofotometria UV. Nos compósitos contendo ibuprofeno utilizou-se um comprimento de onda de absorção máxima de 264 nm e nos compósitos contendo gentamicina um comprimento de onda de 332 nm.



3.6. Técnicas de caracterização

Para aplicações biomédicas a caracterização do material a testar é um passo importante estando referida na primeira parte da norma ISO 10993-1:2003. Esta norma foi desenvolvida pela *Organização Internacional para a Padronização* (ISO – *International Standardization Organization*) que rege a avaliação biológica de dispositivos biomédicos.

Assim, de acordo com esta norma, foram analisadas as propriedades térmicas, estruturais e morfológicas dos materiais adquiridos comercialmente bem como dos produzidos em laboratórios. Seguidamente descrevem-se as técnicas de caracterização usadas.

3.6.1. Difração de Raio-X (DRX)

A análise por difração de raio-X foi realizada num difractómetro *Rigaku Geigerflex D/ Max-SérieC*, equipado com um monocromador curvo de grafite, com uma voltagem de 40KV e uma corrente de 30mA, usando uma radiação emitida $K\alpha$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$). A DRX foi utilizada para identificar as fases cristalinas dos diferentes pós, isto é, dos fármacos e das nanopartículas, e para determinar o tamanho de cristalite (TC) das partículas de ZnO. Os compósitos também foram submetidos a DRX.

Os difratogramas de raios-X obtidos foram comparados com o padrão 00-036-1451 do arquivo JCPDS/ICDD (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards/ International Centre for Diffraction Data; Swarthmore, Pensilvânia, EUA*) referente ao ZnO.

O tamanho de cristalite foi determinado a partir do plano cristalográfico (101) para o ZnO, utilizando-se o quartzo como padrão externo e a equação de Scherrer (Equação 1):

$$T.C. = \frac{0,89\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (\text{Equação 1})$$

em que, T.C. designa o tamanho de cristalite; λ o comprimento de onda ($1,54056 \text{ \AA}$); e θ o ângulo de difração; analisado. β é definido como:

$$\beta = \sqrt{(A_{obs}^2 - a^2)} \quad (\text{Equação 2})$$

em que, A_{obs} refere-se à largura a meia altura do pico da amostra analisar (FWHM) e a refere-se a FWHM da amostra padrão (quartzo). Salienta-se, que no presente trabalho o valor FWHM, da amostra em estudo, foi calculado através do programa *Originlab 8.1*.

3.6.2. Isotérmicas de adsorção

As isotérmicas são apresentadas sob a forma gráfica, representando quantidade adsorvida em função da pressão relativa (p/p^0), em que p^0 é a pressão de saturação da substância adsorvida à temperatura do ensaio.

Em 1940, Brunauer, Deming, Deming e Teller agruparam todas as isotérmicas então conhecidas em cinco tipos (classificação BDDT). Só mais recentemente foi considerado um sexto tipo de isotérmicas. Segundo a IUPAC, a classificação baseia-se nos gráficos da Figura 26. A cada tipo de isotérmica está associado um determinado mecanismo de adsorção:

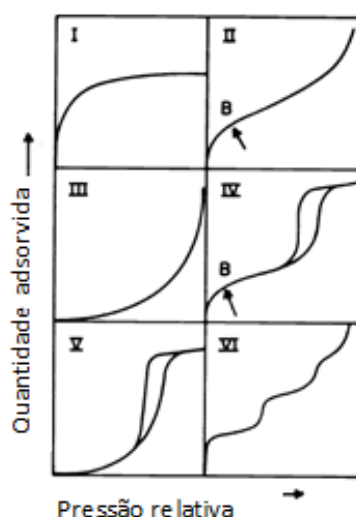


Figura 26 – Classificação da IUPAC para as isotérmicas de adsorção de gases. Adaptado de [81].

A isotérmica do tipo I apresenta um patamar que começa a ser definido a partir de pressões relativamente baixas e está associado a materiais exclusivamente microporosos. O patamar corresponde ao preenchimento dos microporos e a sua altura está relacionada com o volume deste tipo de porosidade. Quanto mais retangular for a curva, mais estreita será a distribuição de tamanho de poros. As isotérmicas do tipo II e IV estão relacionadas com materiais não porosos e materiais com porosidade elevada, respetivamente. As isotérmicas do tipo III são pouco frequentes e apresentam uma adsorção pouco energética comparativamente com a isotérmica do tipo II. A isotérmica do tipo V é característica de materiais com micro e mesoporos, em que adsorção é baseada numa fraca interação gás/sólido. Finalmente, a isotérmica de tipo VI esta associada a superfícies uniformes não porosas e traduzem um mecanismo de adsorção em multicamada [72].



O fenómeno de histerese de adsorção ocorre quando a isotérmica de adsorção não coincide com a isotérmica de dessorção. Segundo a classificação da IUPAC, geralmente, consideram-se quatro tipos principais de histerese e estão representadas na Figura 27. Cada ciclo de histerese está associado a diferentes estruturas de poros.

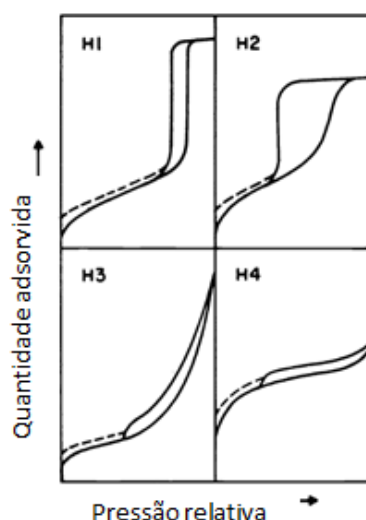


Figura 27 – Classificação dos ciclos de histerese (processos de adsorção/dessorção irreversíveis) segundo as classificações da IUPAC. Adaptado de [81].

A histerese do tipo H1, apresenta dois ramos da isotérmica quase paralelos e está associada a matérias porosas constituídos por aglomerados rígidos de partículas esféricas de tamanho uniforme. A histerese do tipo H2, apresenta o ramo de dessorção vertical e está associada a diferentes mecanismos de condensação e evaporação em poros em forma de garrafa (gargalo estreito e corpo largo). A histerese do tipo H3 está associada a agregados de partículas em forma de placa, originando poros em fenda. Finalmente, a histerese do tipo H4, é caracterizada por dois ramos de isotérmicas quase horizontais e paralelas e está associada a poros estreitos em fenda [81].

- **Modelo Brunauer, Emmett e Teller (BET)**

O modelo Brunauer, Emmett e Teller (BET), aplicado à análise das isotérmicas de adsorção permite determinar a área superficial específica das nanopartículas de ZnO. Este modelo admite um equilíbrio dinâmico entre adsorção e a dessorção, considerando que a adsorção pode ser em multicamada. Só pode ser aplicada em pressões relativas no intervalo de 0,05 a 0,3. Para pressões relativas maiores, a equação de BET fornecerá quantidades adsorvidas menores e maiores do que as reais.



A equação de BET é utilizada na forma linear:

$$\frac{\frac{p}{p^0}}{n^{ads} \left(1 - \frac{p}{p^0} \right)} = \frac{1}{n_m^a c} + \frac{c-1}{n_m^a c} \frac{p}{p^0} \quad (\text{Equação 3})$$

em que p é a pressão de equilíbrio, p^0 é a pressão de saturação à temperatura de adsorção, n^{ads} é a quantidade adsorvida à pressão p e n_m^a é a quantidade adsorvida necessária para preencher a monocamada. O parâmetro c é designado por constante de BET é dado por:

$$c = e^{(E_1 - E_L) / RT} \quad (\text{Equação 4})$$

em que E_1 e E_L representam o calor de adsorção relativa na primeira camada e no calor de condensação de vapor, respetivamente. A representação linear dos dados experimentais, segundo esta equação, é dada na forma de:

$$y = mx + b \quad \text{em que}$$

$$m = \frac{\frac{p}{p^0}}{n^{ads} \left(1 - \frac{p}{p^0} \right)} \quad e \quad b = \frac{p}{p^0} \quad (\text{Equação 5})$$

que permite determinar o numero de moles adsorvidos na monocamada a partir do declive e da ordenada na origem. A área que uma monocamada ocupa na superfície do solido pode ser relacionada com a quantidade adsorvida na monocamada através da expressão seguinte:

$$ASE = n_m^a N_A a_m \quad (\text{Equação 6})$$

em que N_A corresponde ao numero de avogadro e a_m é a área media por uma molécula de adsorvato na monocamada [81].

As áreas superficiais específicas das nanopartículas de ZnO foram assim determinadas pelo método de adsorção física do gás azoto, desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (BET). Para a



realização dos ensaios foi utilizado um equipamento Micromeritics_Gemini 2370V5. Antes da determinação do volume de gás adsorvido, os pós permaneceram em vácuo a 150°C durante 4h.

3.6.3. Espectroscopia de absorção atômica (AAS)

O espectrofotômetro de absorção atômica de marca GCB *Avance* é usado para determinar qualitativamente e quantitativamente os elementos químicos presentes na amostra. Este método baseia-se na absorção de energia radiante na zona do espectro visível e ultravioleta, por átomos em fase gasosa. A amostra a analisar é vaporizada por ação de uma chama (processo de atomização). A sensibilidade deste aparelho estende-se até concentrações na ordem de partes por milhão (ppm) e por vezes de partes por bilhão (ppb).

Neste trabalho utilizou-se esta técnica para quantificar o elemento Na^+ existente nas soluções de lavagem das nanopartículas de ZnO. Para análise do elemento de sódio, utilizou-se o comprimento de onda da absorção da radiação do metal Na^+ de 589,6 nm.

O AAS necessita de ser previamente calibrado tendo-se utilizado para construir a reta de calibração soluções de sódio com 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 ppm. O tempo de leitura para cada solução padrão e para cada amostra foi de 5 segundos.

3.6.4. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

Os pós foram caracterizados morfologicamente por SEM, num microscópio *Hitachi modelo S-4100*. Este microscópio é provido de um sistema de emissão de eletrões com um filamento de tungsténio com potencial de aceleração de 25 KV e resolução máxima de 15 Å.

Para a observação dos pós de ZnO depositaram-se duas gotas de suspensão de pó (10mg/ 10 ml de 2-propanol) numa lamela, previamente fixa com cola de carbono (*Neubauer Chemikalien*, Munster, Alemanha) a um porta-amostra de alumínio plano e polido. Os pós de ibuprofeno e gentamicina, as nanopartículas carregadas e os compósitos produzidos foram depositados sobre fita de carbono.

Todas as amostras foram sujeitas a uma deposição de um filme fino de carbono, num equipamento *Emitech K950*.



3.6.5. Análise térmica diferencial e termogravimétrica (ATD/TG)

A análise térmica diferencial (ATD) tem como objetivo identificar a natureza das reações que ocorrem durante o aquecimento bem como identificar as temperaturas a que ocorrem as principais transformações. A análise termogravimétrica (TG) pretende investigar a variação de massa do material em função do aumento da temperatura. Neste trabalho realizaram-se estas análises num equipamento *Seteram Labsys 1600 DTA/TG-DSC*. Para tal colocaram-se 10 mg de amostra num cadinho de alumina. Utilizou-se assim, uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e diferentes intervalos de temperatura consoante o fármaco em estudo (Tabela 7). A análise foi realizada com numa atmosfera inerte, ou seja, com a utilização de argón.

Tabela 7 – Condições das análises de ATD/TG realizadas aos diferentes materiais.

Material	Taxa de Aquecimento ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Intervalo de Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Atmosfera
Ibuprofeno	10	25 – 350	Árgon
Gentamicina		25 – 450	Árgon

3.6.6. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) permite estudar as frequências de vibração e rotação das moléculas.

A radiação infravermelha não tem energia suficiente para excitar os eletrões, apenas consegue que as ligações dos grupos funcionais vibrem com uma frequência característica, o que faz com que quando se expõe uma determinada amostra a radiação infravermelha, ela absorva essa luz a frequências que são características das ligações químicas presentes nas amostras. A técnica de FTIR pode estar complementada com o ATR (*Attenuater Total Reflectance*). Na técnica de FTIR-ATR o feixe de infravermelhos incide num cristal com um determinado ângulo de incidência, atinge a superfície a analisar e ocorre o fenómeno de reflexão total que se propaga ao longo da superfície do cristal até sair na extremidade oposta. Neste modo o feixe de infravermelhos não atravessa a amostra mas permite a caracterização das ligações químicas presentes na superfície da amostra.



Os espectros foram obtidos num espectrómetro de marca *Bruker*, modelo *Tensor 27*, com uma resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans. Estes foram adquiridos na gama dos 4000 a 350 cm^{-1} .

As amostras foram analisadas pelo laboratório de análises do departamento de química da Universidade de Aveiro.

3.6.7. Espectroscopia de UV

Uma grande variedade de métodos pode ser utilizada para quantificar os antibióticos aminoglicosídicos, como por exemplo: os métodos cromatográficos e os espectrofotométricos. Os métodos espectrofotométricos são os mais utilizados devido a sua rapidez, sensibilidade e por serem relativamente baratos. O princípio deste método consiste na absorção de um determinado comprimento de onda, no espectro de UV, que é característico do composto a analisar. O ibuprofeno pode ser medido diretamente pelo UV ao contrário da Gentamicina que não pode ser medida diretamente.

A gentamicina não é visível no espectro de UV logo é necessário um método indireto para realizar o ensaio de espectrofotometria e assim quantificar o antibiótico. Este método indireto consiste em utilizar um agente derivatizante (o-ftalaldeído) que reage com as aminas primárias e secundárias presentes na molécula de gentamicina formando um composto cromóforo detetado no UV [78].

A solução o-ftalaldeído (OPA) foi preparada de acordo com a referência [78] que consiste na dissolução de $0,25\text{g}$ de o-ftalaldeído numa mistura que contém $6,25\text{ml}$ de metanol e $0,3\text{ ml}$ de 2-mercaptoetanol. Posteriormente foram adicionados 56 ml de borato de sódio ($0,04\text{ M}$, $\text{pH}=8$). A solução OPA foi transferida para um frasco de vidro castanho, revestido com papel de alumínio, ficando assim protegida da luz durante 24 horas. Para quantificar o antibiótico, misturaram-se num copo volumes iguais de solução de gentamicina, de solução de reagente OPA e de 2-propanol (para evitar a precipitação dos produtos formados) e deixaram-se repousar durante 30 min à temperatura ambiente [78].

A quantificação dos fármacos foi realizada por espectroscopia de UV, utilizando um espectrofotómetro UV-3100 *Shimadzu* associado ao programa *UVProbe 2.10*.

De forma a determinar os respetivos comprimentos de onda dos fármacos utilizados procedeu-se a construção de uma reta de calibração através dos espectros obtidos por espectroscopia de UV. Prepararam-se várias soluções aquosas dos fármacos com concentrações conhecidas e procedeu-se ao varrimento destas mesmas soluções no sentido de determinar o



pico máximo de absorvância dos fármacos e assim determinar o respetivo comprimento de onda. Os fármacos foram dissolvidos em diferentes soluções padrão (H_2O e PBS).

No caso da gentamicina, a absorvância foi medida no comprimento de onda de 332 nm contra um branco, preparado como referido anteriormente, mas utilizando em vez da solução da gentamicina, a solução tampão utilizada no carregamento (H_2O) ou a solução utilizada no meio de libertação (PBS).





Capítulo IV





4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos materiais

4.1.1. Nanopartículas de ZnO

Os pós de ZnO adquiridos, ZnOC, ou produzidos pelo método de precipitação química (Figura 23), ZnOP e ZnOA, foram analisados por DRX, SEM e BET.

A Figura 28 mostra o resultado da difração de raios-X (DRX) das amostras de ZnO em estudo neste trabalho. As três amostras apresentam uma única fase hexagonal, com picos intensos, estreitos e bem definidos indicando elevada cristalinidade. Segundo a ficha cristalográfica JCPDS 00-036-1451 do ZnO, os picos de difração foram indexados à célula unitária hexagonal do tipo *Wurtzite* devido a identificação dos planos {100}, {002}, {101}, {102}, {110}, {103}, {200}, {112}, {201}, {004} e {202}. Estes resultados indicam que as amostras consistem numa única fase cristalina, não apresentando formação de fases secundárias ou impurezas. Os resultados de DRX indicam assim que é possível obter facilmente partículas de ZnO pelo método de precipitação química com a ocorrência de uma única fase cristalina.

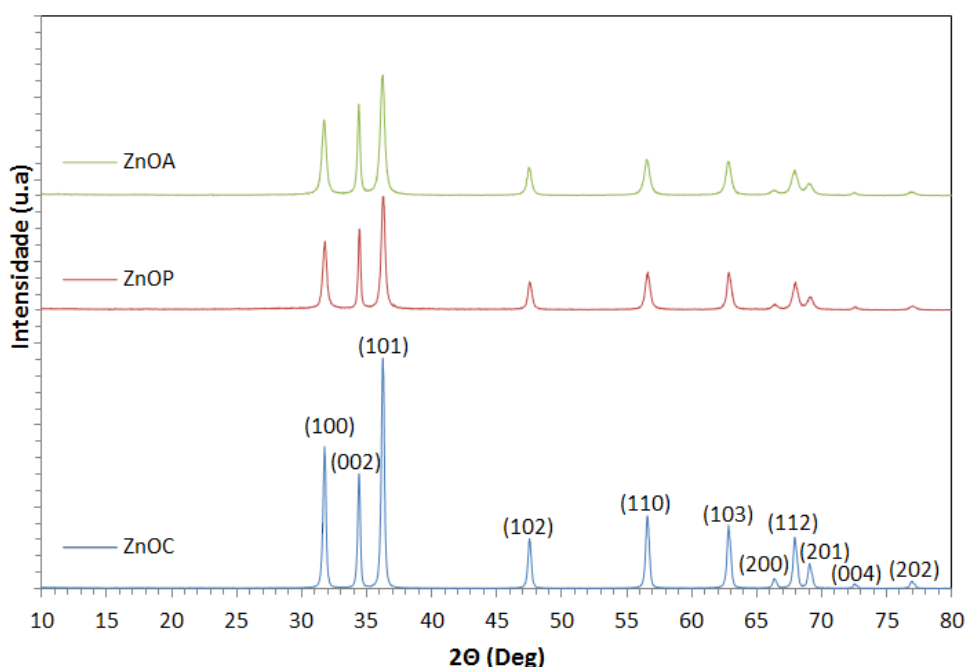


Figura 28 - Difratoograma de raios-X dos pós de ZnO adquiridos comercialmente (—ZnOC) e dos pós precipitadas (— ZnOP e — ZnOA).



A razão de intensidade dos picos do DRX correspondentes aos planos (002) e (101) ($I_{(002)}/I_{(101)}$) é igual a 0,50; 0,72 e 0,76 para o ZnOC, ZnOP e ZnOA, respetivamente. Estes valores são superiores a 0,44, o correspondente valor padrão para o ZnO *wurtzite* [82]. Assim, é provável a ocorrência de diferentes orientações cristalográficas nas partículas produzidas por precipitação química e no pó adquirido comercialmente. Estas diferentes orientações cristalográficas podem resultar de eventuais diferenças nos métodos de preparação utilizados.

Os tamanhos de cristalite foram determinados pela equação de *Debye-Scherrer* (secção 3.6.1) usando o pico de difração correspondente ao plano (101). Obtiveram-se os valores de 65, 117 e 42 nm para as amostras de ZnOC, ZnOP e ZnOA respetivamente. O ZnOP apresenta maior cristalinidade uma vez que possui um maior tamanho de cristalite em relação aos restantes pós.

As micrografias obtidas para o ZnO comercial (ZnOC) encontram-se na Figura 29 e as obtidas para os diferentes pós precipitados (ZnOP e ZnOA) na Figura 30. O pó de ZnOC apresenta-se irregular em termos de morfologia e distribuição do tamanho das partículas, revelando-se uma mistura de grandes agregados de partículas de ZnO com morfologias que variam desde esféricas a placas nanométricas.

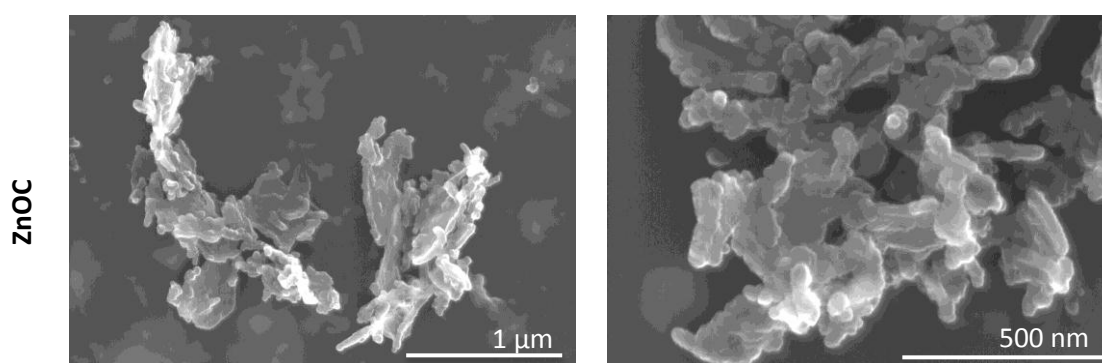


Figura 29 – Micrografias de SEM do ZnO adquirido comercialmente (ZnOC) com diferentes ampliações.

Os pós precipitados revelaram uma estrutura complexa e organizada. O ZnOP apresenta uma morfologia esférica em forma de flores, constituídas por subunidades em forma de nanoplacas com uma espessura média de 42 nm. As medições foram realizadas em pelo menos 2 micrografias tiradas em diferentes regiões da amostra, sendo medidas mais de 10 nanoplacas em cada micrografia. O ZnOA apresenta-se também com uma morfologia esférica, melhor definida que no caso anterior, constituída por subunidades em forma de nanoplacas também com uma espessura média de 42 nm. O ZnOP apresenta um tamanho médio de partícula de 4,5 µm e o ZnOA de 4 µm.

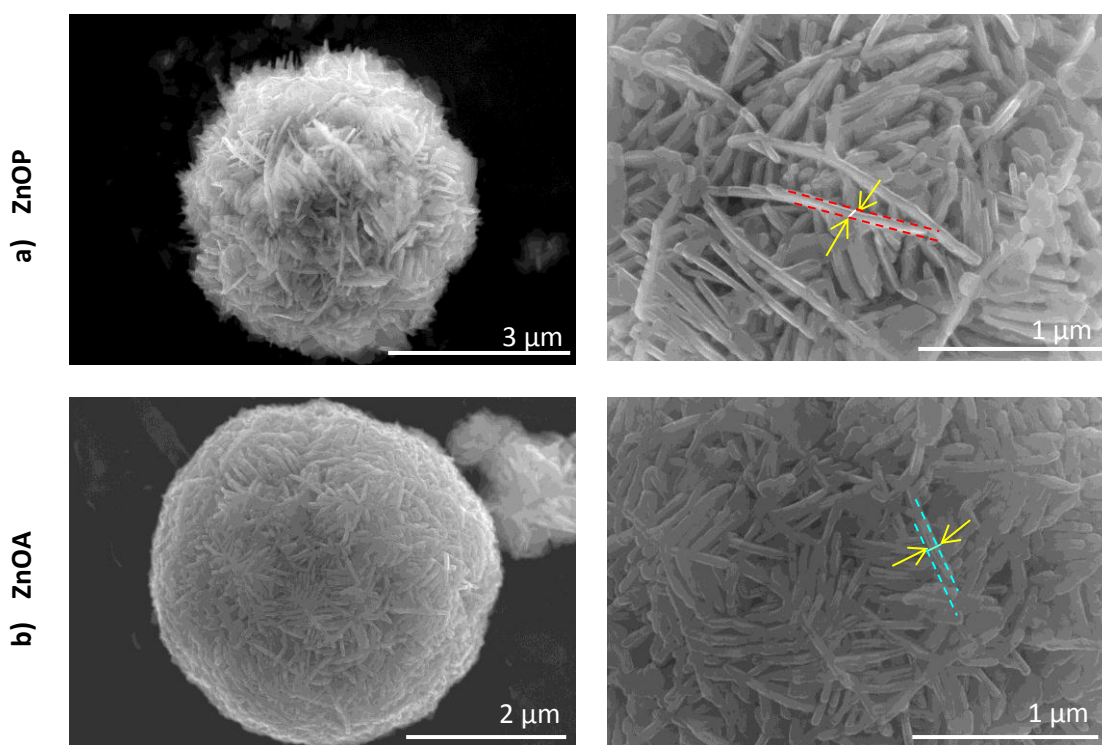


Figura 30 – Micrografias de SEM das amostras de a) ZnOP e b) ZnOA com diferentes ampliações. A distância entre as setas corresponde a 42 nm.

As isotérmicas de adsorção/dessorção dos pós de ZnO adquiridos e dos precipitados estão representados na Figura 31 e a distribuição dos poros destes pós na Figura 32.

Segundo a classificação da IUPAC (Figura 26) o pó comercial ZnOC apresenta uma isotérmica do tipo II referente a materiais não porosos.

Os pós precipitados, ZnOP e ZnOA, exibem uma isotérmica do tipo IV correspondente a materiais com elevada porosidade, nomeadamente mesoporosos com condensação capilar mesoporosa. Apresentam ainda uma histerese do tipo H3 que indica a presença de poros em fenda. Este resultado está de acordo com o que se observa nas micrografias de SEM anteriormente apresentadas para ambas as amostras.

O tamanho médio de poro obtido corresponde a 11,9 e 10,8 nm para o ZnOP e ZnOA, respetivamente (Tabela 8).

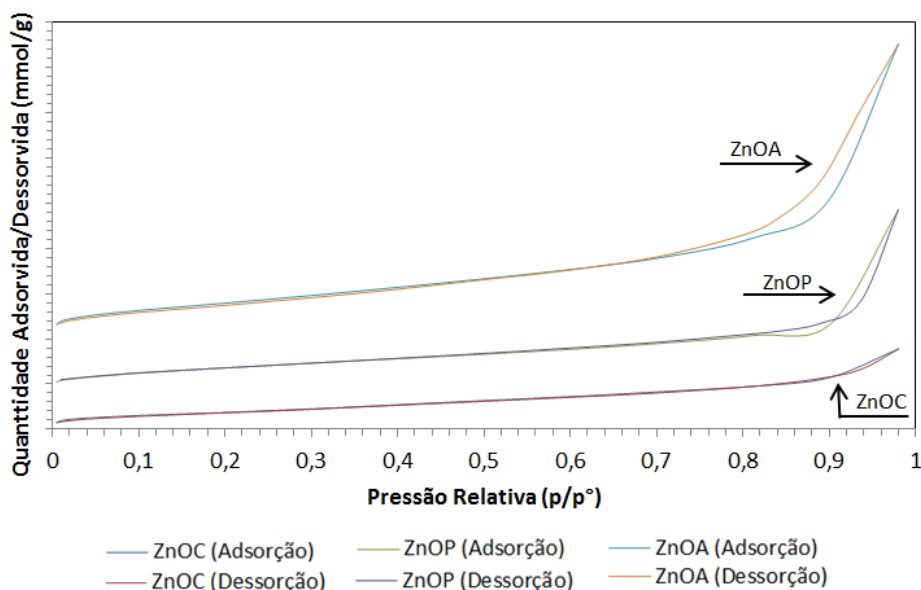


Figura 31 – Isotérmicas de adsorção/dessorção dos pós de ZnOC, ZnOP e ZnOA.

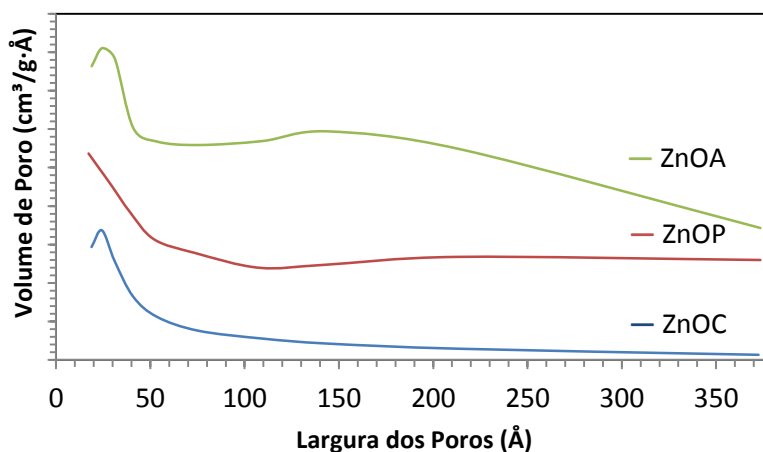


Figura 32 – Distribuição do tamanho de poros dos pós de ZnO em análise: (—) ZnOC, (—) ZnOP e (—) ZnOA.

Na Tabela 8 encontram-se sumariados algumas das principais características dos diferentes pós de ZnO nanoestruturados apresentados neste trabalho.

As áreas superficiais específicas (ASE) dos pós ZnOC, ZnOP e ZnOA são respetivamente $14,8 \pm 0,2$; $15,6 \pm 0,8$ e $31,4 \pm 0,7$ m²/g. A diferença encontrada no caso dos pós precipitados pode explicar-se com base na diferença entre os métodos de preparação dos meios precipitantes dos pós de ZnO. No método P, que originou os pós ZnOP com ASE = 15,6 m²/g, a adição do agente alcalino foi feita a um caudal de 41,6 ml/min através de um pulverizador e no método A, de que resultaram os pós ZnOA, com ASE = 31,4 m²/g, a adição da solução alcalina foi feita a um caudal



menor, de 28,1 ml/min. Uma vez que pela via do pulverizador se adiciona, por unidade de tempo, uma maior quantidade de reagente sob a forma de uma fina dispersão de inúmeras gotículas de solução básica à solução ácida recetora, seria expectável que estas condições tivessem propiciado uma sobressaturação inicial mais elevada de que teria resultado uma maior velocidade de nucleação, ou seja, a formação de maior número de núcleos do que no caso da bureta. Nestas condições o tamanho final de partícula obtido no caso do dispersor deveria ser inferior ao obtido no caso da bureta, o que não se observa. O que se verifica é que, aparentemente, as morfologias de partícula são muito semelhantes, embora as áreas específicas sejam substancialmente diferentes. Uma possível explicação para estas observações poderá ser a seguinte: no caso do dispersor, numa fase muito inicial da precipitação, quando os núcleos começaram a crescer, o elevado número de partículas com dimensões muito reduzidas e com elevadíssima energia de superfície poderá ter sofrido agregação, ocorrendo assim um crescimento por agregação de partículas ou nanoplaças. Deste facto teria resultado uma estabilização do sistema colocando-o em condições energéticas equivalentes ao sistema da bureta e portanto desenvolvendo a partir daí uma morfologia muito semelhante ao observado no caso da bureta. Neste contexto a diferença de área entre os dois tipos de partículas refletiria o fenómeno de agregação inicial (que teria reduzido o número de partículas em crescimento) e a formação de porosidade menos profunda, no caso das partículas obtidas com pulverizador, e consequentemente, estruturas com menores ASE. Em oposição, a adição da solução alcalina a 28,1 ml/min (Método A) deverá originar um menor número de núcleos, que originarão partículas inicialmente maiores e menos reativos que poderão crescer organizadamente na forma de nanoplaças, originando no final estruturas com maior ASE.

O diâmetro esférico equivalente (DEE) é determinado pela equação:

$$DEE = \frac{6}{ASE \times \rho} \quad (\text{Equação 7})$$

em que ρ é a densidade teórica do ZnO (5,6 g/cm³).

Assim, a partir da ASE dos pós e assumindo que os pós apresentam uma forma esférica calculou-se um diâmetro esférico equivalente (DEE) de 72, 69 e 34 nm para o ZnOC, ZnOP e ZnOA, respetivamente (Tabela 8). Estes resultados indicam que apesar das partículas possuírem diâmetros da ordem dos microns, por conseguinte superiores a 100 nm (limite máximo na classificação de nanopartícula) [4, 83], as respetivas áreas superficiais são equivalentes a



partículas com um diâmetro esférico inferior a 72 nm, o que permite atribuir-lhes a designação de nanopartículas ou partículas nanoestruturadas.

Tabela 8 – Características dos pós de ZnO: comercial (ZnOC) e dos pós precipitados (ZnOP e ZnOA).

Pós	Cristalite (nm)	Tipo de Isotérmica	ASE (m ² /g)	TP _{médio} (nm)	D.E.E. (nm)
ZnOC	65	II	14,8 ± 0,2	6,8	72,1
ZnOP	117	IV-H3	15,6 ± 0,8	11,9	68,7
ZnOA	42	IV-H3	31,4 ± 0,7	10,8	34,1

ASE – Área Superficial Específica; TP_{médio} – Tamanho médio de poro. DEE – Diâmetro esférico equivalente.

Em suma, os pós precipitados apresentaram ASE e tamanho de poros superiores aos do ZnO adquirido comercialmente. Todos os pós produzidos por precipitação encontram-se dentro dos limites da classificação “nano” adotada na literatura.

No espectro de infravermelho (IV), a posição, a forma e a intensidade das bandas dá informação sobre os grupos funcionais presentes na molécula. Na Figura 33 encontra-se o espectro de IV dos pós de ZnO em estudo neste trabalho. A banda a 436 cm⁻¹ corresponde a ligação Zn-O. A 3443 cm⁻¹ ocorre absorção devido às vibrações de alongamento da ligação do grupo hidroxilo (-OH) [84]. Normalmente moléculas com grupos OH apresentam espectros com bandas largas devido às ligações do hidrogénio, como é observado na Figura 33.

A absorção a 1394 cm⁻¹ e a 1637 cm⁻¹ são atribuídas à vibração de alongamento simétrica e assimétrica dos grupos carboxílicos (-COO⁻) presentes na molécula do ácido cítrico [84].

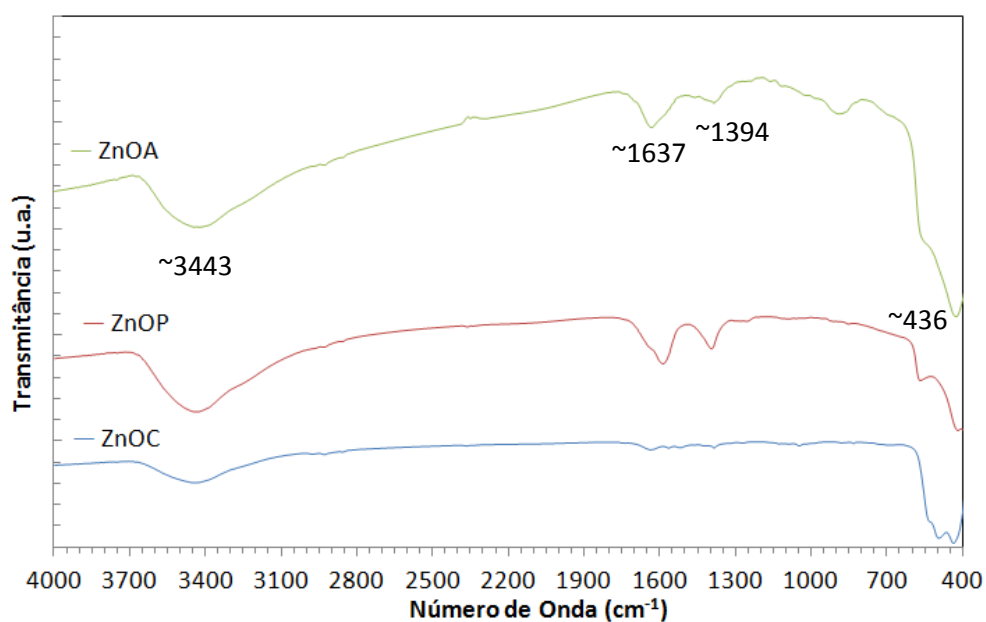


Figura 33 – Espectro de infravermelhos das amostras de (—) ZnOC, (—) ZnOP e (—) ZnOA.

Tabela 9 – Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 33.

Bandas de absorção no Infravermelho (cm ⁻¹)		
Presente trabalho	Referência [84].	Descrição
~3443	~3438	Alongamento OH
~1637	~1638	Alongamento C=O
~436	~445	Zn-O

4.1.2. Poliuretano

O poliuretano foi adquirido comercialmente sendo da marca *Tecoflex*®. Na Figura 34 encontra-se o difratograma do filme que se preparou do poliuretano comercial. Verifica-se que o filme *Tecoflex*® apresenta uma estrutura amorfa.

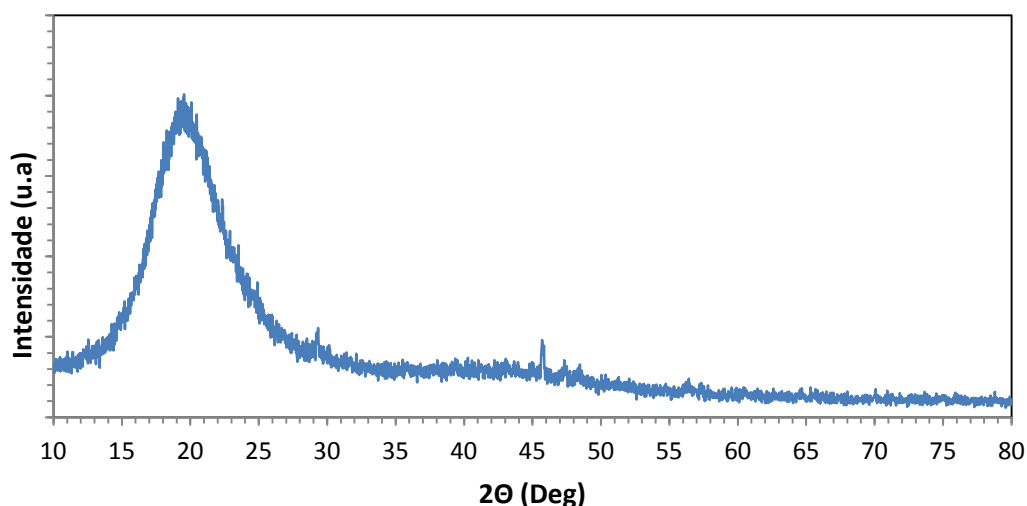


Figura 34 – Difratoograma de raio-X do filme de Poliuretano.

A Figura 35 apresenta o espectro de infravermelho do PU *Tecoflex*[®]. As atribuições dos picos estão referidas na Tabela 10.

O poliuretano apresenta uma banda a 3310 cm^{-1} (assinalada como (a)) que é atribuída ao alongamento da ligação N-H. Os picos de 2931 cm^{-1} (b), 2851 cm^{-1} (c) e 2800 cm^{-1} (d) são atribuídos ao alongamento da ligação C-H tanto do poliéter como do ciclo hexano, e o pico de 1714 cm^{-1} (e) é atribuído ao alongamento livre da ligação C=O. Os picos de absorção de 1103 cm^{-1} (m) e 1045 cm^{-1} (n) referem-se ao alongamento C-O-C assimétrico do poliéter e dos componentes da ligação uretano, confirmando que se trata de um polímero poliuretano poliéter [85]. Os restantes picos estão identificados na Tabela 10.

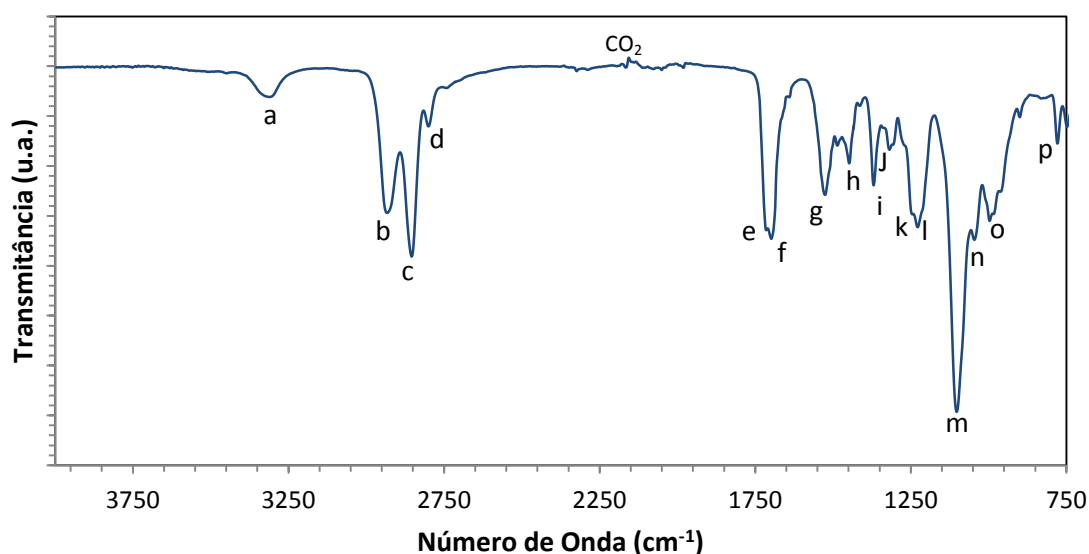


Figura 35 – Espectro de infravermelhos do poliuretano comercial.



Tabela 10 – Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 35.

Banda	Bandas de absorção no Infravermelho (cm ⁻¹)		Descrição
	Presente trabalho	Referência [85]	
a	~3310	~3323	Alongamento N-H
b	~2931	~2933	Alongamento assimétrico CH ₂ : Cβ do poliéter e ciclohexano
c	~2851	~2854	Alongamento assimétrico CH ₂ : Cα/ Cβ do poliéter e ciclohexano
d	~2800	~2795	Alongamento simétrico CH ₂ : Cα do poliéter
e	~1714	~1719	Alongamento livre C=O
f	~1699	~1701	Alongamento C-O
g	~1525	~1529	Alongamento C-N e Flexão N-H
h	~1448	~1447	Flexão CH ₂
i	~1369	~1367	Wagging CH ₂
j	~1319	~1320	Alongamento C-C (ciclo hexano)
k	~1248	~1245	Wagging CH ₂
l	~1228	~1228	Alongamento C-N
m	~1103	~1110	Alongamento assimétrico C-O-C: Poliéter
n	~1045	~1044	Alongamento assimétrico C-O-C: uretano
o	~900	~900	Alongamento assimétrico do anel: ciclohexano
p	~779	~779	Anel do ciclohexano

4.1.3. Fármacos

4.1.3.1. Ibuprofeno

A análise térmica diferencial (ATD) do ibuprofeno comercial revelou a presença de três picos endotérmicos não simétricos a 87, 128 e 285°C (Figura 36). O pico endotérmico nos 87°C, não apresenta correspondente perda de massa na curva termogravimétrica (TG), devendo referir-se ao ponto de fusão do ibuprofeno [86]. O segundo pico, a 128°C, não apresenta correspondente perda de massa na curva TG e não foi encontrada na literatura referência à ocorrência de qualquer reação a esta temperatura; poderá ser um vestígio de impureza no fármaco adquirido. O pico a 285°C indica o ponto de ebulição do ibuprofeno [86]. A evaporação do ibuprofeno inicia-se a aproximadamente 170°C e prolonga-se até 285°C sendo de 95% a perda de massa final.

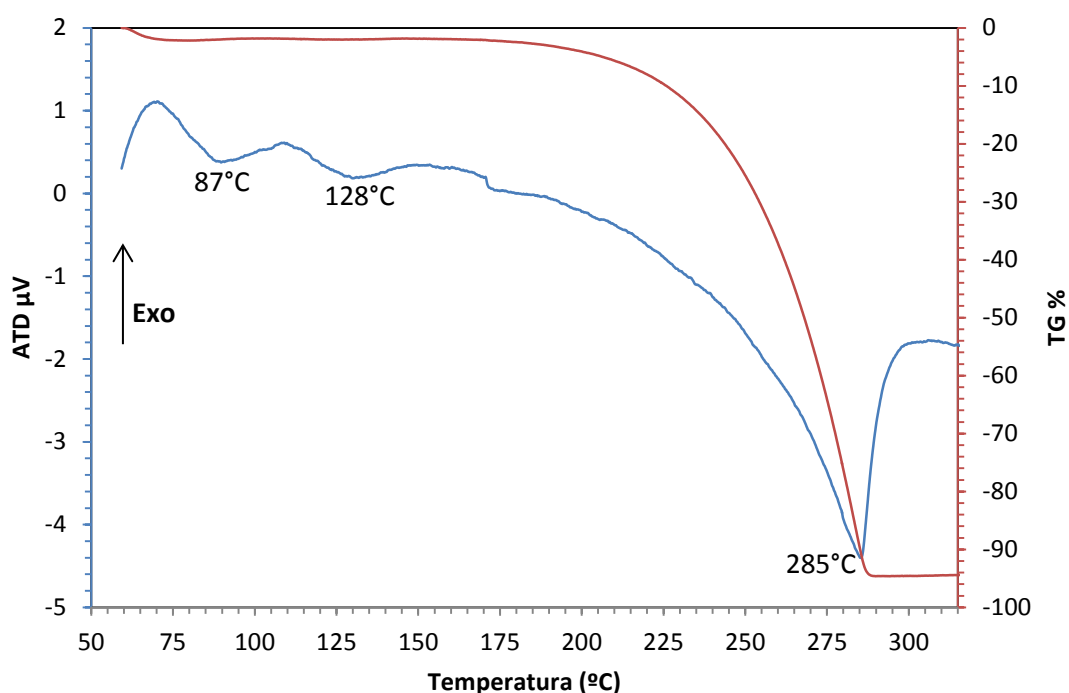


Figura 36 – ATD/TG do ibuprofeno a uma taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de árgon.

O espectro de infravermelhos para o pó de ibuprofeno está representado na Figura 37 e as respectivas identificações de bandas de absorção encontram-se na Tabela 11.

Verifica-se um pico de maior intensidade nos 1710 cm^{-1} (assinalada como (4) na Figura 37) que corresponde ao alongamento da ligação C=O. As bandas de 3088 cm^{-1} (1) e 2955 cm^{-1} (2) são atribuídas ao alongamento assimétrico da ligação CH_2 e CH_3 , respetivamente. A 1508 cm^{-1} (5) verifica-se o alongamento da ligação C=C do anel aromático. Nos 1184 cm^{-1} (9) e 970 cm^{-1} (10) as bandas de absorção estão relacionadas com o alongamento da ligação C-O e da ligação C-O-C, respetivamente [86]. As atribuições dos restantes picos assinalados na Figura 37 encontram-se descritas na Tabela 11.

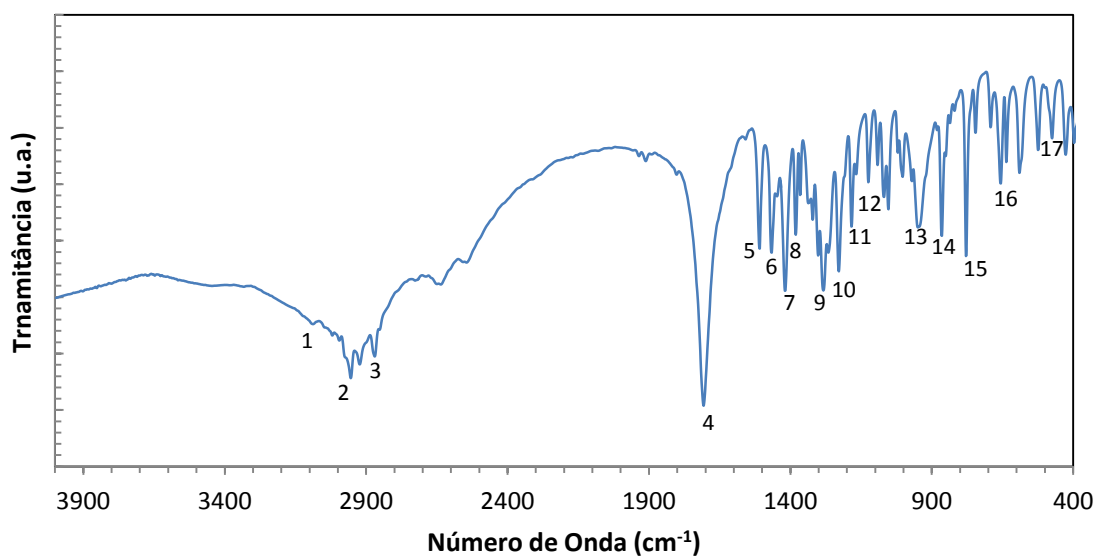


Figura 37 – Espectro de infravermelhos do pó de Ibuprofeno.

Tabela 11 – Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 37.

Banda	Bandas de absorção no Infravermelho (cm ⁻¹)		Descrição
	Presente trabalho	Referência [86]	
1	~3088	~3090	Alongamento assimétrico CH ₂
2	~2955	~2955	Alongamento assimétrico CH ₃
3	~2870	~2869	Alongamento simétrico CH ₂
4	~1710	~1721	Alongamento C=O
5	~1508	~1507	Alongamento C=C do anel aromático
6	~1465	~1462	Deformação assimétrica CH ₃ , Tesoura CH ₂
7	~1420	~1420	Deformação CH-CO
8	~1381	~1380	Alongamento simétrico CH ₃
9	~1282	~1268	=C-H no plano deformação
10	1228	~1231	Alongamento C-C
11	~1184	~1183	Alongamento C-O
12	~970	~970	Alongamento C-O-C
13	~946	~936	Vibração de deformação em balanço (<i>Rocking</i>) CH ₃



14	~864	~866	C-H fora do plano deformação
15	~779	~779	Deformação em Baloioço CH ₂
16	~659	~668	C-H fora do plano de deformação
17	~474	~479	Vibração de deformação CH ₂ /CH ₃

4.1.3.2. Gentamicina

A ATD da gentamicina comercial revelou a presença de três picos endotérmicos aos 113, 236 e 277°C (Figura 38). A gentamicina resulta da mistura de três componentes C₁, C₂ e C_{1a}. O pico a 113°C corresponde ao ponto de fusão da gentamicina C_{1a} e C₂ [87]. Os picos endotérmicos a 236°C e 277°C referem-se ao ponto de fusão do complexo gentamicina [87]. A perda de massa final até 440°C é de 59%.

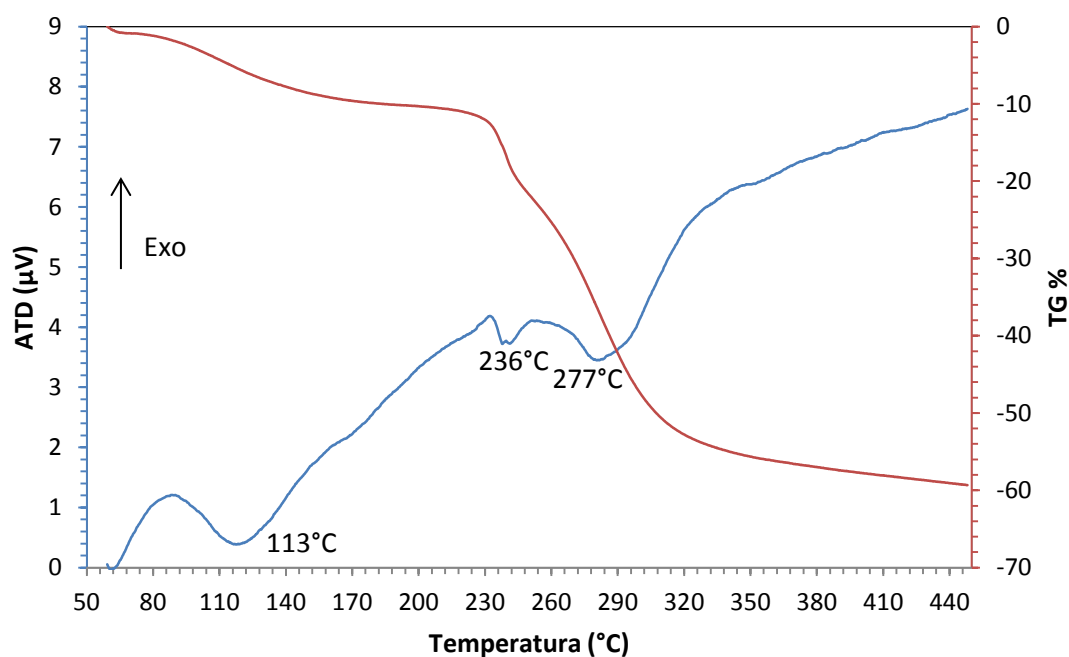


Figura 38 – Curvas de ATD/TG da Gentamicina obtidas a uma taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de argon.

O espectro de infravermelhos para o pó de gentamicina está representado na Figura 39 e as respectivas identificações de banda de absorção na Tabela 12.

O pico de maior intensidade verifica-se a 1126 cm⁻¹ e é atribuído ao alongamento da ligação C-O e HSO₂⁻. A ligação SO₂ verifica-se a 619 cm⁻¹. Quer a ligação HSO₂⁻ quer a SO₂ resultam do grupo sulfato presente na gentamicina. A 3422 cm⁻¹ a banda é atribuída ao alongamento das ligações OH,



NH_3^+ e NH_2^+ e a 1616 cm^{-1} a banda de absorção é atribuída a banda simétrica do NH_3^+ e NH_2^+ [88]. As restantes bandas características das ligações da gentamicina encontram-se referidas na Tabela 12.

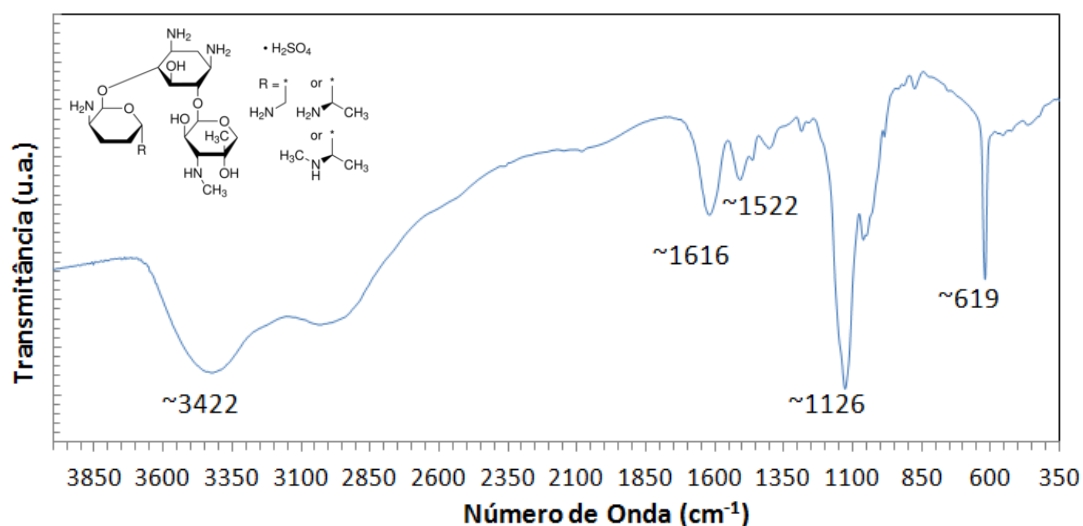


Figura 39 – Espectro de infravermelhos do pó de gentamicina comercial.

Tabela 12 – Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 39.

Bandas de absorção no Infravermelho (cm^{-1})		Descrição
Presente trabalho	Referência [88]	
~3422	~3421	Alongamento OH, NH_3^+ e NH_2^+
~1616	~1637	Simétrica NH_3^+ , NH_2^+
~1522	~1533	NH_3^+ , NH_2^+
~1126	~1126	Alongamento C-O, HSO_4^-
~619	~618	SO_2

4.2. Carregamento e caracterização das nanopartículas

Estudou-se o carregamento com fármaco das nanopartículas de ZnO comerciais e das nanopartículas produzidas pelo método de precipitação química. Utilizaram-se, como já foi referido, dois fármacos modelo: o ibuprofeno e a gentamicina.

Para o estudo de carregamento das nanoestruturas de ZnO variou-se o tempo de contacto com o fármaco no sentido de avaliar a sua eficiência de carregamento, ou seja, a percentagem de



fármaco efetivamente carregado (Figura 40). Este estudo preliminar foi realizado para as nanopartículas comerciais e para o carregamento efetuado com gentamicina. Verificou-se que a percentagem de fármaco adsorvida aumenta com o tempo de contacto, com tendência para a desacelerar ao fim de seis dias de incubação. Com base neste resultado, todos os pós produzidos neste trabalho e o pó adquirido comercialmente foram colocados numa solução de fármaco, com igual concentração de fármaco, durante 6 dias.

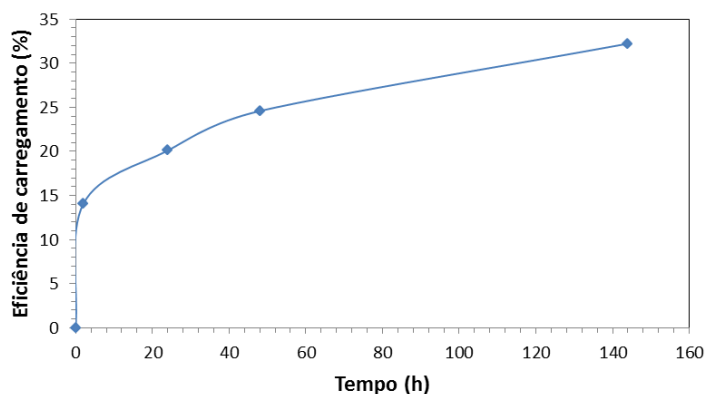


Figura 40 – Eficiência de carregamento de fármaco ao longo do tempo.

Ao fim de seis dias de imersão das nanopartículas na solução de fármaco, obteve-se uma eficiência de carregamento do ibuprofeno de 84, 60 e 86% para as nanopartículas ZnOC, ZnOP e ZnOA, respetivamente. No caso da gentamicina obteve-se uma eficiência de carregamento de 47, 65 e 53% para as nanopartículas ZnOC, ZnOP e ZnOA, respetivamente (Tabela 13).

Tabela 13 – Resultados do carregamento do fármaco nos vários tipos de nanopartículas em estudo neste trabalho, após seis dias de contacto com a solução do fármaco.

<u>Amostra</u>		ASE (m ² /g)	Massa de fármaco adsorvido/massa de nanopartícula (mg/mg)	Massa de fármaco adsorvido/ área de partícula (mg/m ²)	Eficiência de carregamento (%)
Ibu	ZnOC	14,8	0,016	1,08	84
	ZnOP	15,6	0,012	0,77	60
	ZnOA	31,4	0,017	0,54	86
Genta	ZnOC	14,8	0,0095	0,64	47
	ZnOP	15,6	0,013	0,83	65
	ZnOA	31,4	0,011	0,35	53



Idealmente, para que um sistema possa ser utilizado em liberação controlada de fármaco deve apresentar uma elevada capacidade de carregamento no sentido de permitir minimizar a quantidade de material a ser introduzido no organismo para alcançar a dose terapêutica [89].

Segundo os resultados, para o ibuprofeno as nanopartículas de ZnOA são as que apresentam maior quantidade de fármaco carregado por unidade de massa de partícula. No caso da gentamicina são as nanopartículas de ZnOP as que apresentam maior quantidade de fármaco carregado (mg fármaco/mg partícula).

Os materiais produzidos neste trabalho apresentam citratos adsorvidos a superfície do material que não foram removidos nas lavagens. Dependendo do tipo de fármaco, estes citratos poderão influenciar o comportamento de adsorção dos fármacos, ou seja, poderão condicionar a capacidade adsortiva do material por disputarem locais de superfície adequados à adsorção do fármaco [5]. Os diferentes pós evidenciam capacidades adsortivas (massa fármaco/unidade de área de partícula) diferentes o que denuncia estados de superfície diferentes que provavelmente refletem as diferenças das suas condições de síntese. Observa-se também que o pó ZnOA é aquele que evidencia menor capacidade adsortiva.

A eficiência de carregamento traduz o efeito conjunto da área superficial de partícula e da capacidade adsortiva da mesma [89]. Em termos de eficiência de carregamento, os valores obtidos no caso do Ibuprofeno são comparáveis aos de *Chen et al* [70] que, nos seus estudos produziram nanopartículas mesoporosas de sílica (ASE de 1300 m²/g) e procederam ao carregamento destas com ibuprofeno alcançando uma eficiência de carregamento de 69%.

Após carregamento, as nanopartículas de ZnO com gentamicina e ibuprofeno foram caracterizadas por SEM, FTIR e TG.

Na Figura 41 são apresentadas as micrografias obtidas por SEM dos pós de ZnOC/Ibu, ZnOP/Ibu, ZnOA/Ibu ZnOC/Genta, ZnOP/Genta e ZnOA/Genta. Todas as micrografias de SEM evidenciam a existência de partículas aglomeradas com diferentes tamanhos e sem alterações significativas relativamente as partículas precursoras (Figura 29, Figura 30).

Sugere-se que, globalmente, as características morfológicas das várias nanopartículas estudadas não foram afetadas pela adsorção dos fármacos, ou seja, as nanopartículas apresentam-se estáveis face ao processo de carregamento a que estiveram sujeitas.

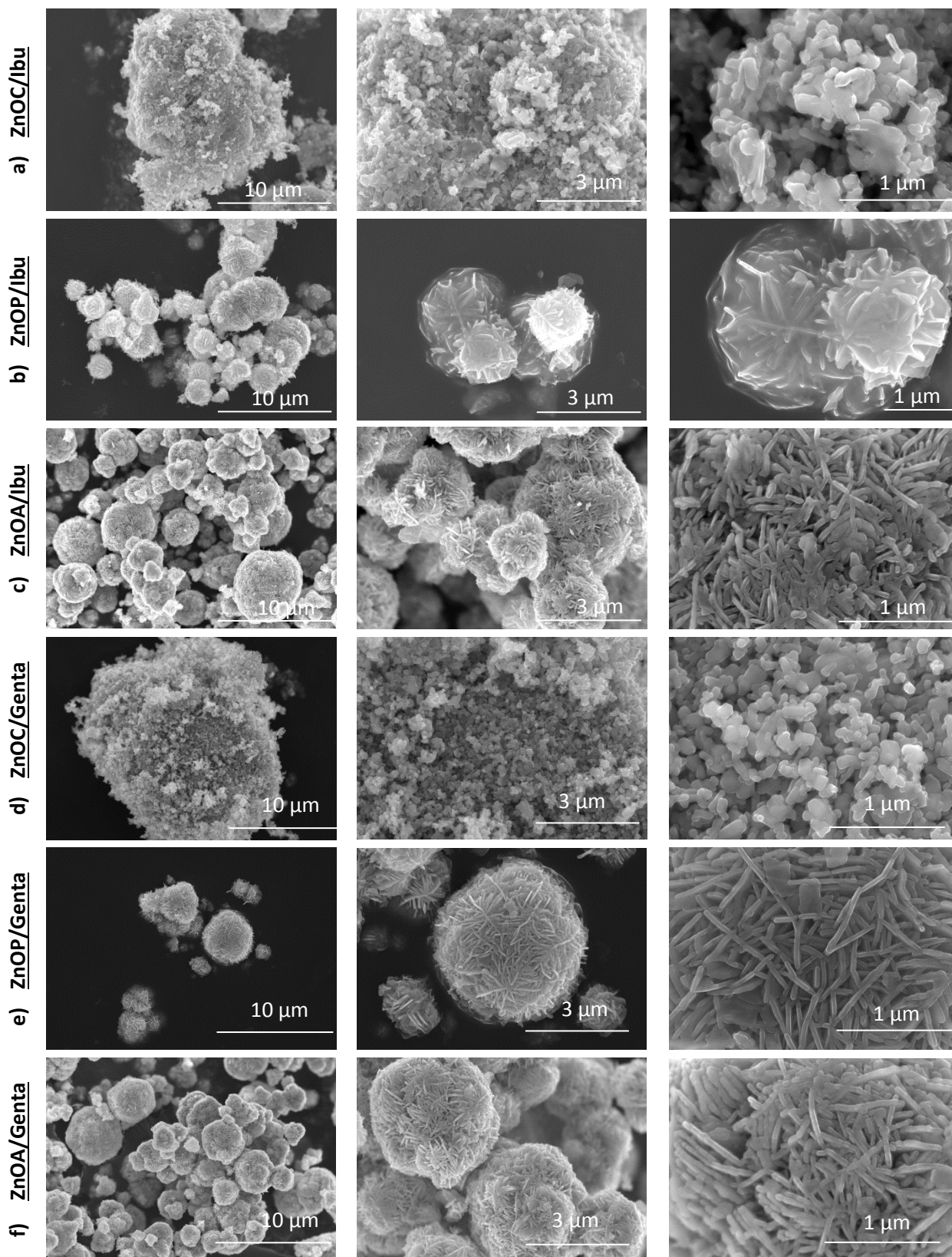


Figura 41 – Micrografias obtidas por SEM dos pós: a) ZnOC/Ibu, b) ZnOP/Ibu, c) ZnOA/Ibu, d) ZnOC/Genta, e) ZnOP/Genta e f) ZnOA/Genta com diferentes ampliações.



Por forma a avaliar a presença do fármaco, as nanopartículas carregadas foram caracterizadas por análise térmica gravimétrica (TG) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os resultados destas análises são a seguir apresentados e em separado, para o ibuprofeno e para a gentamicina.

4.2.1. Caracterização das nanopartículas com ibuprofeno

Na Figura 42a estão representadas as curvas de TG das nanopartículas com ibuprofeno. As amostras ZnOC/Ibu, ZnOP/Ibu e ZnOA/Ibu mostraram uma perda de 2,98, 4,55 e 3,94% sobre a massa total, respetivamente até aos 116°C. Esta perda de massa é atribuída à perda de moléculas de água adsorvidas na amostra. Seguidamente observa-se em todas as amostras uma perda de massa que se prolonga até aos 350°C. A Figura 42a evidencia também na faixa de temperaturas 200 a 275°C uma perda de peso, particularmente visível no caso dos pós ZnO C e que é atribuído à perda de ibuprofeno que nesta faixa de temperatura, na condição de substância isolada, sofre perda de massa quase total por ebulição (Figura 36). Os pós ZnOC são aqueles que evidenciaram maior capacidade adsortiva de Ibuprofeno como atrás referido (tabela 13). Nesta mesma faixa de temperatura ocorre também degradação térmica de citratos e correspondente perda de massa nos pós precipitados (ZnOA e ZnOP).

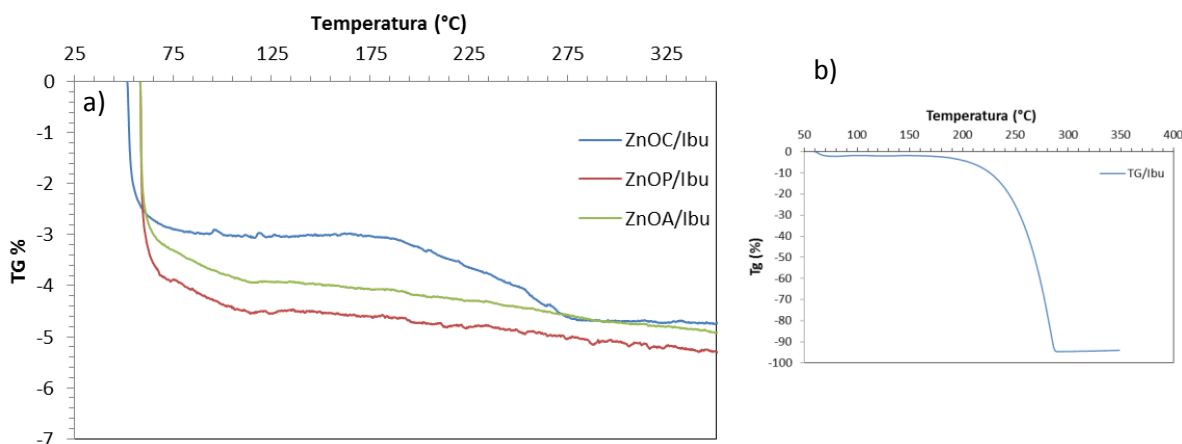


Figura 42 – Curva de TG a) dos pós (—) ZnOC/Ibu, (—) ZnOP/Ibu e (—) ZnOA/Ibu e b) do ibuprofeno. Os pós ZnOC são os que adsorvem maior quantidade de IBU por unidade de área (curva azul).

Os espectros de FTIR das nanopartículas com ibuprofeno são apresentados na Figura 43. Os pós de ZnOC e ZnOP apresentam alterações quando carregados com ibuprofeno. As diferenças correspondem ao aparecimento de dois picos a 1721 cm^{-1} e 790 cm^{-1} que estão associados ao



alongamento da ligação C=O e a deformação da ligação CH₂ pertencente ao ibuprofeno, respetivamente. Estes picos comprovam que existe ibuprofeno adsorvido nas nanopartículas de ZnO. O espectro de FTIR correspondente ao pó ZnOA/Ibu não permitiu a clara identificação das referidas bandas do Ibuprofeno.

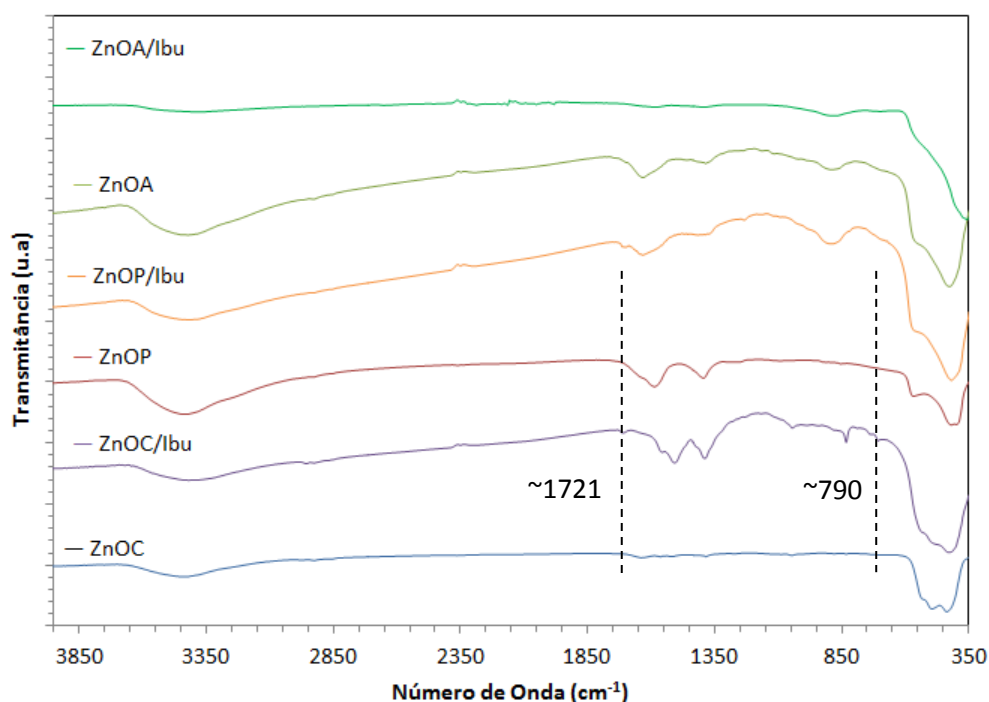


Figura 43 – Espetros de infravermelhos dos pós (—) ZnOC, (—) ZnOP e (—) ZnOA e dos pós com ibuprofeno (—) ZnOC/Ibu, (—) ZnOP/Ibu e (—) ZnOA/Ibu.

4.2.2. Caracterização das nanopartículas com gentamicina

Na Figura 44a estão representadas as curvas TG das nanopartículas com gentamicina. As amostras ZnOC/Genta, ZnOP/Genta e ZnOA/Genta mostraram uma perda de 4,05, 2,68 e 3,94% sobre a massa total, respetivamente, até aos 105°C. Esta perda de massa é fundamentalmente atribuída à perda de moléculas de água adsorvidas na amostra. A partir dos 105°C observa-se uma perda de massa que se prolonga até aos 500°C. Tomando como indicativo o comportamento térmico da gentamicina isoladamente (Figura 44b), esta perda de massa pode estar associada quer ao fármaco, cuja fusão deve ocorrer antes de 300°C, quer à perda de matéria orgânica nomeadamente de citratos, que não foi eliminada após a precipitação.

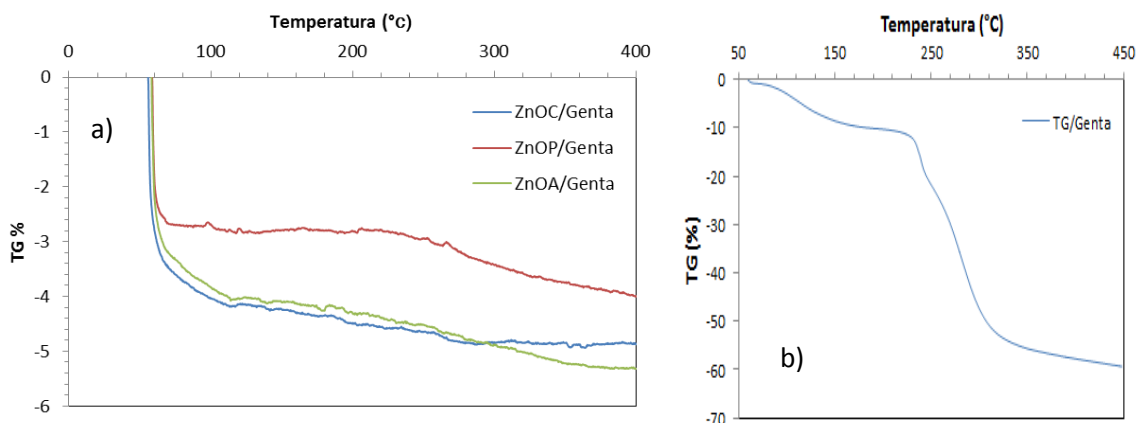


Figura 44 – Curva de TG dos pós de a) (—) ZnOC/Genta, (—) ZnOP/Genta e (—) ZnOA/Genta e b) de gentamicina. Os pós ZnOP são os que adsorvem maior quantidade de gentamicina por unidade de área (curva vermelha).

Os pós de ZnOC e ZnOP apresentam alterações quando carregados com gentamicina. As diferenças correspondem ao aparecimento de um pico a 1123 cm^{-1} que está associado ao alongamento da ligação C-O e HSO_4^- pertencente a gentamicina, respectivamente. Este pico, que corresponde ao pico mais intenso da gentamicina comprova a existência de gentamicina nas nanopartículas de ZnO. Além deste pico o ZnOC e o ZnOP apresentam um pico a 1635 cm^{-1} que corresponde a ligação simétrica de NH_3^+ e NH_2^+ .

Tal como já observado no caso ibuprofeno, não foi possível detetar a presença de bandas associadas à gentamicina na amostra ZnOA/Genta.

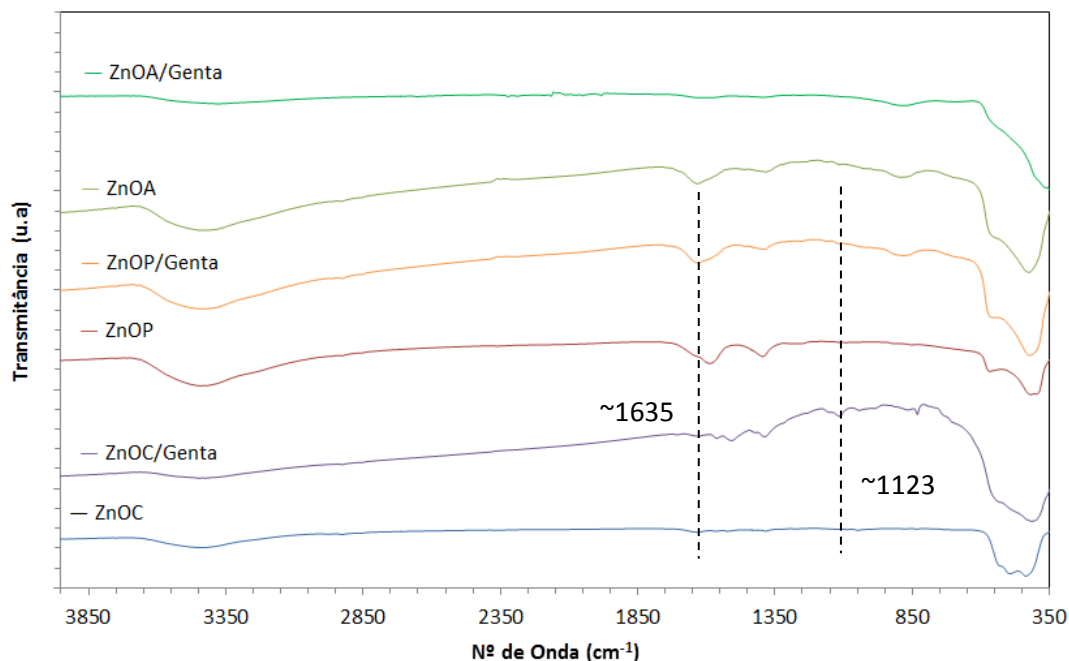


Figura 45 – Espectros de infravermelhos dos pós (—) ZnOC, (—) ZnOP e (—) ZnOA e dos pós com ibuprofeno (—) ZnOC/Genta, (—) ZnOP/Genta e (—) ZnOA/Genta.



4.3. Caracterização dos compósitos de PU/ZnO

Os compósitos de PU/ZnO com gentamicina e ibuprofeno foram caracterizados por DRX, SEM e FTIR. Os resultados de DRX mostraram que os compósitos de PU/ZnO contêm fases cristalinas. Todas as amostras apresentam picos estreitos e bem definidos (em anexo encontram-se os difratogramas dos compósito PU/ZnO carregados: com ibuprofeno na Figura A2 e com gentamicina na Figura A3) não se verificando alterações significativas em relação aos difratogramas das nanopartículas precursoras (Figura 28). Assim a única fase cristalina presente é o ZnO hexagonal do tipo *wurtzite*.

Na Figura 46 são apresentadas as micrografias obtidas por SEM dos compósitos produzidos denominados como PU/ZnOC/Ibu, PU/ZnOP/Ibu, PU/ZnOA/Ibu, PU/ZnOC/Genta, PU/ZnOP/Genta e PU/ZnOA/Genta (de acordo com a nomenclatura estabelecida na Tabela 6). Os compósitos PU/ZnOC/Ibu e PU/ZnOC/Genta apresentam uma camada de poliuretano superficial mais extensa que nos restantes compósitos. No que se refere aos restantes compósitos (PU/ZnOP/Ibu, PU/ZnOP/Genta, PU/ZnOA/Ibu e PU/ZnOA/Genta) as micrografias de SEM apresentam o poliuretano a envolver as nanopartículas de forma bastante irregular, podendo observar-se ramificações de poliuretano a ligar as nanopartículas. Neste contexto, sugere-se a possibilidade de diferenças de molhabilidade das partículas comerciais relativamente às precipitadas poder explicar a diferença da extensão de recobrimento das partículas pelo PU.

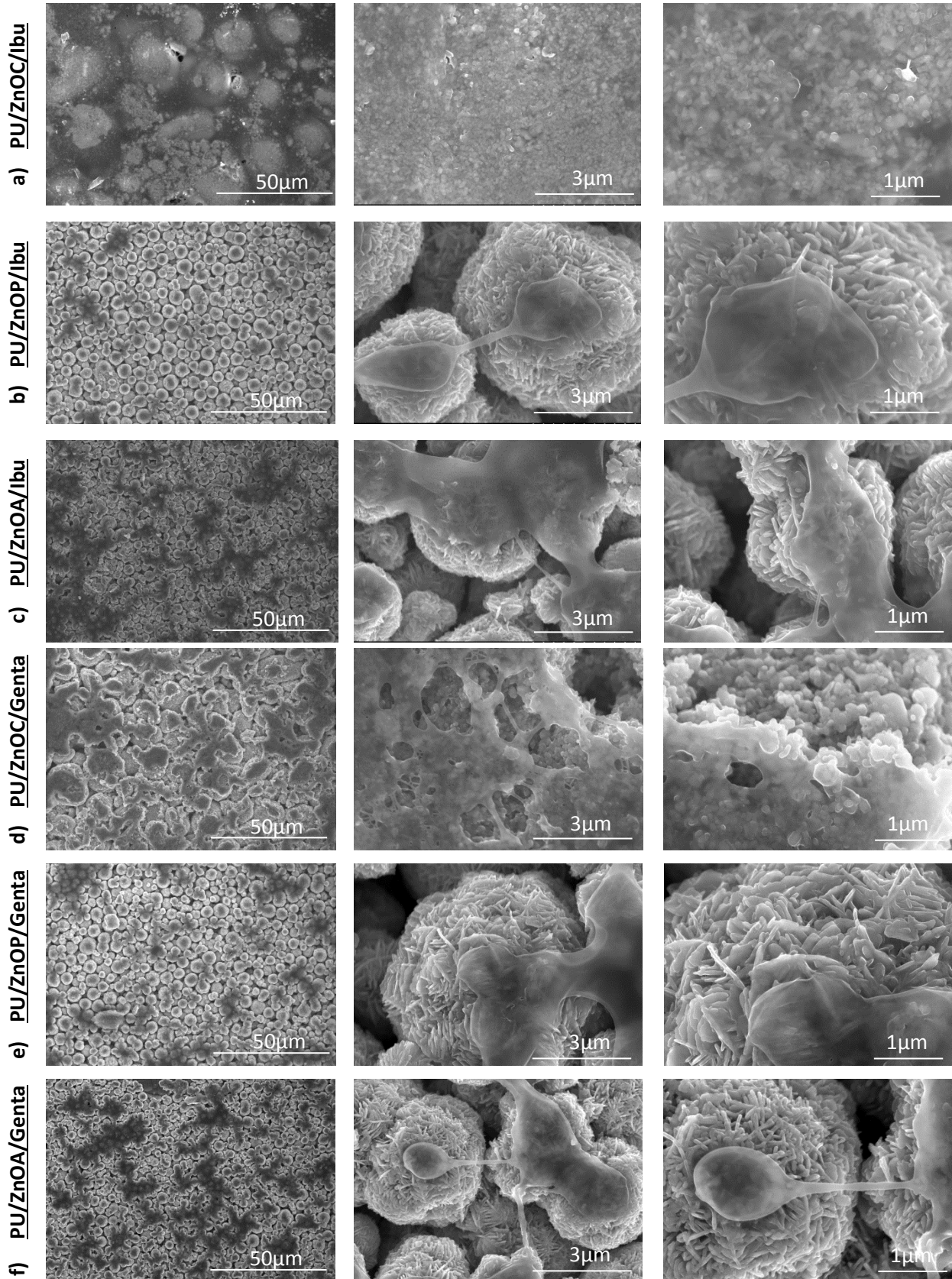


Figura 46 – Micrografias de vistas de topo dos compósitos a) PU/ZnOC/Ibu, b) PU/ZnOP/Ibu, c) PU/ZnOA/Ibu, d) PU/ZnOC/Genta, e) PU/ZnOP/Genta e f) PU/ZnOA/Genta com diferentes ampliações.



Na Figura 47 apresentam-se os espectros de infravermelho dos compósitos em estudo neste trabalho. Observa-se maioritariamente a presença de bandas típicas do poliuretano. Os espectros apresentam a 2931 cm^{-1} e a 2854 cm^{-1} bandas associadas ao alongamento assimétrico do CH_2 e a 2797 cm^{-1} uma banda relativa ao alongamento simétrico do CH_2 . Estes alongamentos devem-se à presença de poliéter e ciclohexanos no poliuretano [85]. As bandas observadas a 1693 cm^{-1} e a 1229 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento da ligação C-O e C-N, respetivamente. A 422 cm^{-1} observa-se a banda correspondente à vibração da ligação Zn-O. As restantes bandas e a respetiva identificação estão sumariadas na Tabela 14.

A espectroscopia de infravermelhos dos compósitos não revela assim qualquer interação específica entre os fármacos e o polímero visto não se terem observado alterações significativas na intensidade e posição das bandas de absorção relativamente aos espectros do poliuretano (Figura 35) e das nanopartículas com os fármacos adsorvidos (Figura 43 e 45).

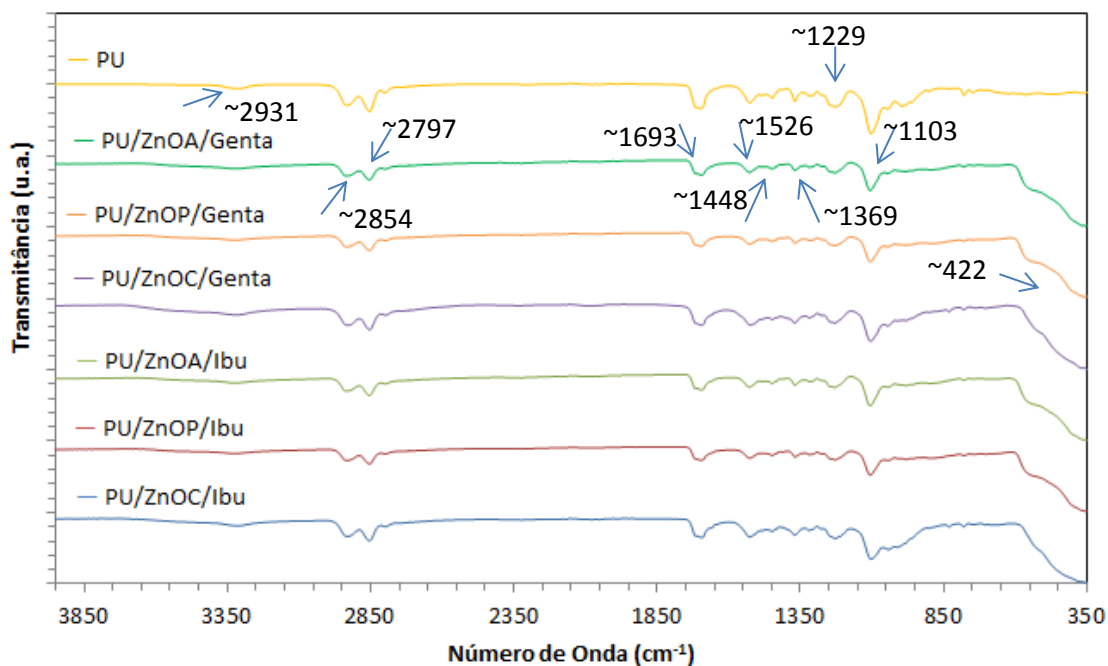


Figura 47 - Espectro de infravermelhos dos compósitos (—) PU/ZnOC/Ibu, (—) PU/ZnOP/Ibu, (—) PU/ZnOA/Ibu, (—) PU/ZnOC/Genta, (—) PU/ZnOP/Genta, (—) PU/ZnOA/Genta e (—) PU puro.



Tabela 14- Identificação de bandas de absorção no infravermelho observadas nos espectros apresentados na Figura 47.

Bandas de absorção no Infravermelho (cm ⁻¹)		Descrição
Presente trabalho	Referência	
~2931	~2933 (PU)	Alongamento assimétrico CH ₂ : Cβ do poliéter e ciclohexano
~2854	~2854 (PU)	Alongamento assimétrico CH ₂ : Cα/Cβ do poliéter e ciclohexano
~2797	~2795 (PU)	Alongamento simétrico CH ₂ : Cα do poliéter
~1693	~1701 (PU)	Alongamento C-O
~1526	~1529 (PU)	Alongamento C-N e flexão N-H
~1448	~1447 (PU)	Deformação CH ₂
~1369	~1367 (PU)	Wagging CH ₂
~1229	~1228 (PU)	Alongamento C-N
~1103	~1110 (PU)	Alongamento assimétrico C-O-C: poliéter
~422	~445 (ZnO)	Zn-O

4.4. Estudo da libertação de fármacos *in vitro*

Neste subcapítulo apresentam-se os resultados do estudo *in vitro* da libertação dos fármacos ibuprofeno e gentamicina. Os ensaios *in vitro* foram realizados numa solução tampão de fosfatos (PBS) a pH=7,4 e a 37 °C numa estufa rotativa a 125 rpm.

A quantidade de fármaco libertado para a solução foi avaliada por espectroscopia de UV, ao comprimento de onda característico de cada fármaco. A identificação do comprimento de onda a que os fármacos absorvem bem como a construção das retas de calibração utilizadas para determinação da concentração de fármaco encontram-se documentados nos anexos.

4.4.1. Libertação do Ibuprofeno

Nas Figura 48 e Figura 49 apresentam-se os perfis de libertação do ibuprofeno, ou seja, a variação da percentagem de fármaco libertado ($\% \text{ fármaco libertada} = \left(\frac{\text{massa de fármaco libertada}}{\text{massa de fármaco carregada}} \times 100 \right)$) com o tempo (expresso em horas), para as nanopartículas e para os compósitos, respetivamente. Na Figura 50 apresenta-se a variação com o tempo da quantidade de ibuprofeno libertada, expressa em valor absoluto (mg de fármaco libertado/mg de



partícula). Observa-se que as diferentes amostras apresentam perfis de liberação com alguns aspectos em comum, evidenciando designadamente três estágios distintos: um estágio inicial caracterizado por uma liberação rápida seguida de um segundo estágio de liberação em que a liberação se apresenta globalmente mais lenta, mas com vários andamentos a diferentes velocidades e, finalmente, um último estágio em que a velocidade de liberação é muito lenta, praticamente nula. Assim, neste trabalho, durante as primeiras 8h observa-se um rápido aumento da quantidade de fármaco libertado. Após esse período inicial ocorre uma diminuição da taxa de liberação evidenciada pela mudança na inclinação da curva. A partir das 360h a taxa de liberação é praticamente nula. Esta liberação em três estágios é habitualmente denominada na literatura por comportamento trifásico [89].

A liberação rápida no estágio inicial (primeiras horas) denomina-se por “*burst effect*” e poderá ser justificada pela presença de uma certa quantidade de fármaco à superfície das nanopartículas ou na proximidade destas, no caso dos compósitos [89]. O ibuprofeno difunde a partir dos poros e a partir da superfície das partículas de ZnO devido ao gradiente de concentração, ou seja, inicialmente o gradiente de concentração é elevado e as moléculas do fármaco tendem a libertar-se rapidamente. Posteriormente ao *burst effect* existe uma liberação em sequência ou seja, existe a liberação do fármaco de modo “intermitente” ao longo do tempo que é diferente de pó para pó. Este comportamento poderá refletir as diferentes características de porosidade existente nos vários tipos de nanoestruturas em análise. A porosidade característica e a forma como se processa a renovação do fármaco do interior dos poros poderá assim, ajudar a explicar a liberação em patamares. Futuramente, dever-se-á estudar mais detalhadamente a contribuição do tamanho de poro e da sua distribuição para este comportamento a fim de se compreender melhor os resultados obtidos.

As nanopartículas de ZnOC/Ibu, ZnOP/Ibu e ZnOA/Ibu apresentam ao fim de 31 dias (744h) uma percentagem de liberação de 72, 50 e 34%, respetivamente.

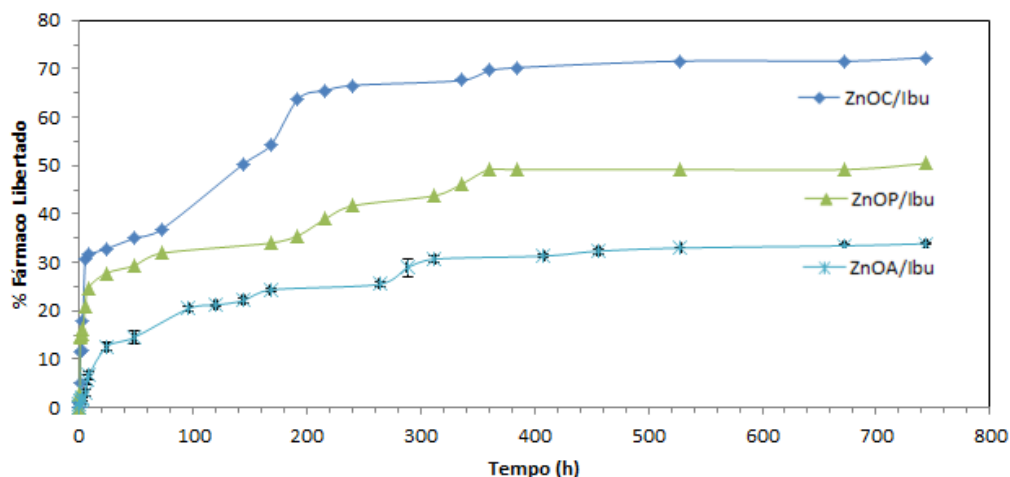


Figura 48 - Perfis de liberação de ibuprofeno (% de fármaco libertado) a partir das diferentes partículas de ZnO (ZnOC, ZnOP e ZnOA).

Analisando comparativamente o comportamento dos compósitos e o das nanopartículas verifica-se que em todos os compósitos existe uma forte diminuição da quantidade de ibuprofeno libertado. Assim, para os compósitos PU/ZnOC/Ibu, PU/ZnOP/Ibu e PU/ZnOA/Ibu a percentagem de fármaco libertado ao fim de 31 dias é de apenas 0,95, 0,84 e 0,22 %. Este resultado indica que a matriz polimérica atua como uma barreira que retarda fortemente a difusão do fármaco, permitindo a sua libertação mas de uma forma muito mais lenta [42]. Além disto, observam-se andamentos semelhantes nas curvas de libertação dos compósitos e nas curvas de libertação das nanopartículas, ou seja, as curvas de libertação dos nanopartículas são como que replicadas pelas curvas de libertação dos correspondentes compósitos. Assim, apesar de se verificar que o poliuretano inibe a difusão do fármaco verifica-se que a tendência no perfil de libertação das nanopartículas precursoras não é substancialmente alterada e a libertação sequencial é mantida nos compósitos. Esta semelhança é particularmente evidente nas curvas de ZnOC/Ibu e de PU/ZnOC/Ibu.

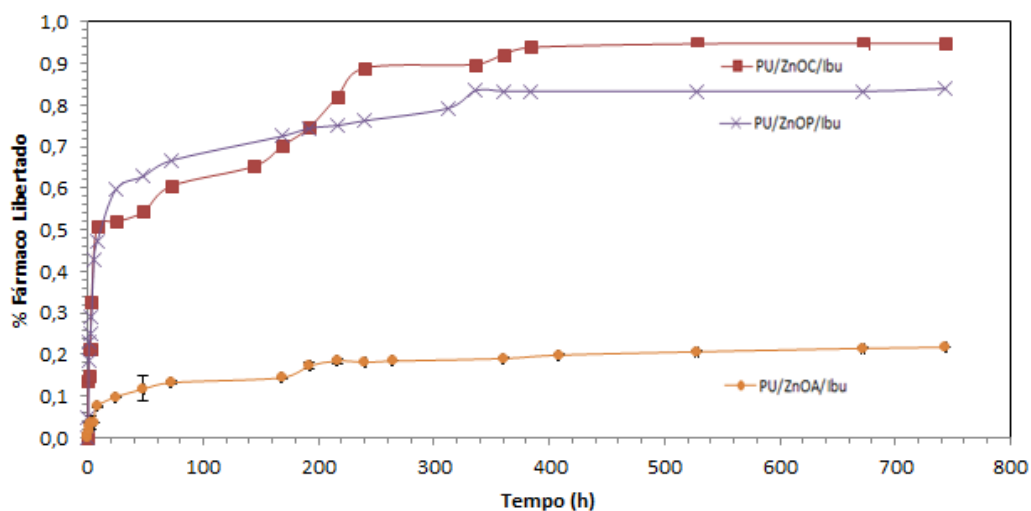


Figura 49 – Perfis de liberação de ibuprofeno (% de fármaco libertado) a partir dos diferentes compostos (PU/ZnOC, PU/ZnOP e PU/ZnOA).

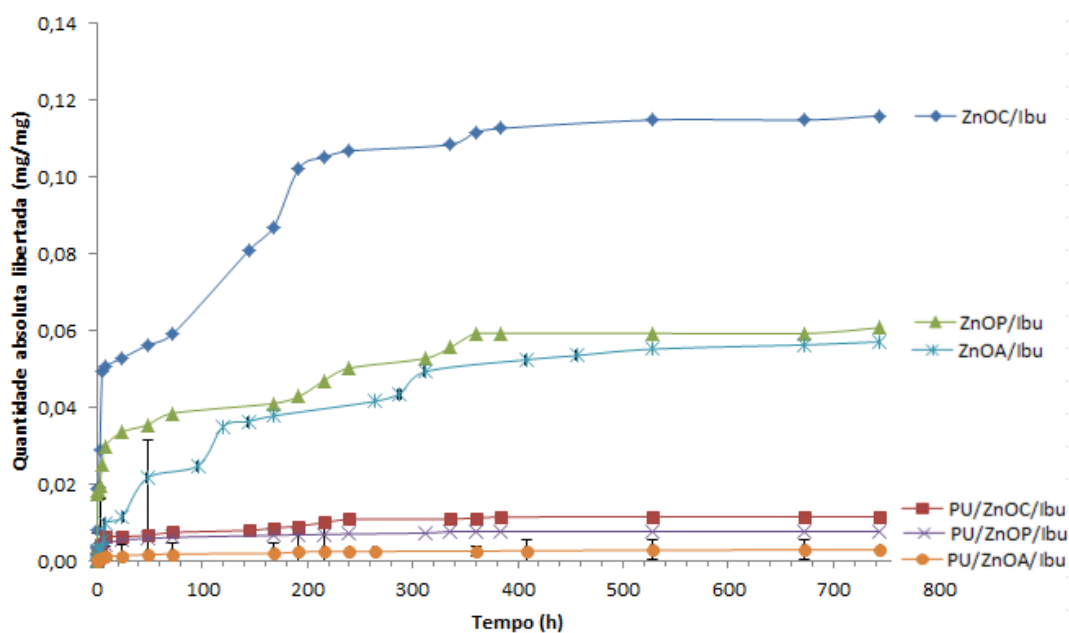


Figura 50 - Quantidade absoluta de ibuprofeno libertado a partir de nanopartículas de ZnO e dos respectivos compostos ao longo do tempo.

O composto PU/ZnOP/Ibu liberta inicialmente uma maior percentagem de Ibuprofeno do que o PU/ZnOA/Ibu. Assim, quer as nanopartículas ZnOA/Ibu quer o correspondente PU/ZnOA apresentam a menor percentagem de liberação deste fármaco. Sugere-se assim que, possivelmente, o ibuprofeno adsorveu mais fortemente na superfície das nanopartículas de ZnOA e, consequentemente é menos suscetível de sofrer dessorção como parecem indicar os presentes



resultados. As partículas ZnOA foram as que adsorveram menor quantidade de fármaco por unidade de área o que também sugere que a adsorção tenha ocorrido em sítios preferenciais que propiciaram uma forte ligação do fármaco á superfície.

Não foram encontrados, na literatura, até ao momento, estudos referentes à libertação de ibuprofeno a partir de nanopartículas de ZnO ou de compósitos de PU/ZnO. No entanto, existem estudos referentes à utilização de nanopartículas de sílica como sistemas de transporte de ibuprofeno [69]. Neste estudo, verificou-se que ao final de 1h o sistema libertava 80% de ibuprofeno e ao fim de 3h atingia os 100% [69]. Comparando estes resultados com os obtidos no presente trabalho verifica-se que a libertação do fármaco a partir das nanopartículas de ZnO é muito mais lento prolongando-se por um período de tempo mais extenso.

No que se refere aos compósitos a literatura refere a utilização de poliuretano associado a nanopartículas de albumina [42] e a nanopartículas de montmorilonite (silicato de alumina) [45] para transporte dos fármacos *cefamandole nafate* e acetato de dexametasona, respetivamente. Em ambos os casos confirma-se que a matriz polimérica exerce um efeito de travagem da libertação de fármacos, embora não tão acentuado como o que se observa no presente trabalho.

A libertação inicial (*burst effect*) observada nas primeiras 8 horas pode ser interessante do ponto de vista clinico, uma vez que em terapias anticancerígenas é desejável alcançar concentrações elevadas de fármaco em redor do tumor no início do tratamento, seguido de uma libertação contínua dos fármacos a uma taxa suficiente para manter os níveis terapêuticos no tumor [90].

Em suma, observa-se no presente trabalho que os compósitos apresentam um perfil de libertação semelhante ao das nanopartículas correspondentes embora libertem o fármaco em menor quantidade. Na tabela seguinte sumarizam-se as principais observações referentes aos perfis de libertação do ibuprofeno representados nas Figura 48 e Figura 49.

Tabela 15 – Observações referentes às curvas de libertação do ibuprofeno a partir de nanopartículas de ZnO e dos respetivos compósitos.

Característica/Amostras	ZnOC	ZnOP	ZnOA	PU/ZnOC	PU/ZnOP	PU/ZnOA
% Libertação inicial (<i>burst effect</i>)	+++	++	+	++	+++	+
% Libertação (Globalmente)	+++	++	+	+++	++	+

Legenda: variação da percentagem de fármaco libertado, de menor (+) até maior (+++).



4.4.2. Liberação da gentamicina

Na Figura 51 e 52 representam-se as curvas de liberação da gentamicina para as nanopartículas de ZnO e para os compósitos, respetivamente. Na Figura 53 representa-se a quantidade absoluta (mg de gentamicina libertada/mg de partícula) de gentamicina libertada nos dois sistemas referidos anteriormente.

Analisando as curvas de liberação observa-se uma liberação rápida nas primeiras 8 horas, seguida de uma liberação mais lenta até 380 horas. Após as 380 horas verifica-se uma pequena diminuição da velocidade de liberação do fármaco que se prolonga até as 744 horas, não estabilizando ao fim desse tempo. Assim, globalmente, o perfil de liberação da gentamicina é semelhante ao perfil de liberação do ibuprofeno à exceção da quantidade de fármaco libertado e da não estabilização da liberação do fármaco, no caso do ibuprofeno a liberação estabiliza ao fim de 400 horas.

Ao fim de 744 horas as nanopartículas ZnOC/Genta, ZnOP/Genta e ZnOA/Genta atingiram os 25, 11 e 19% de fármaco libertado, respetivamente. Comparativamente com o observado no caso do ibuprofeno, estes valores são substancialmente mais baixos. No caso dos compósitos PU/ZnOC/Genta, PU/ZnOP/Genta e PU/ZnOA/Genta, estes atingiram 0,23, 0,14 e 0,26 % de fármaco libertado, respetivamente.

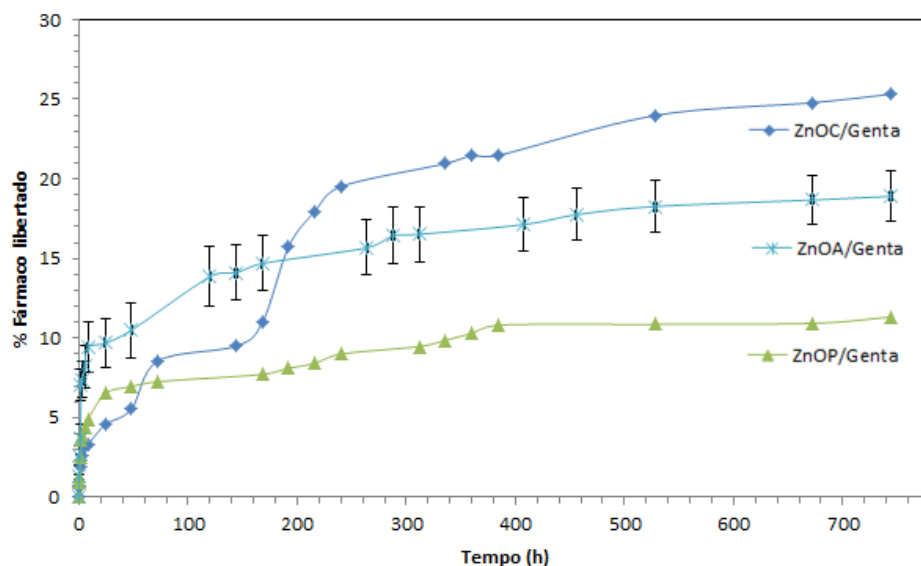


Figura 51 - Perfis de liberação da gentamicina (% de fármaco libertado) a partir das diferentes partículas de ZnO (ZnOC, ZnOP e ZnOA).

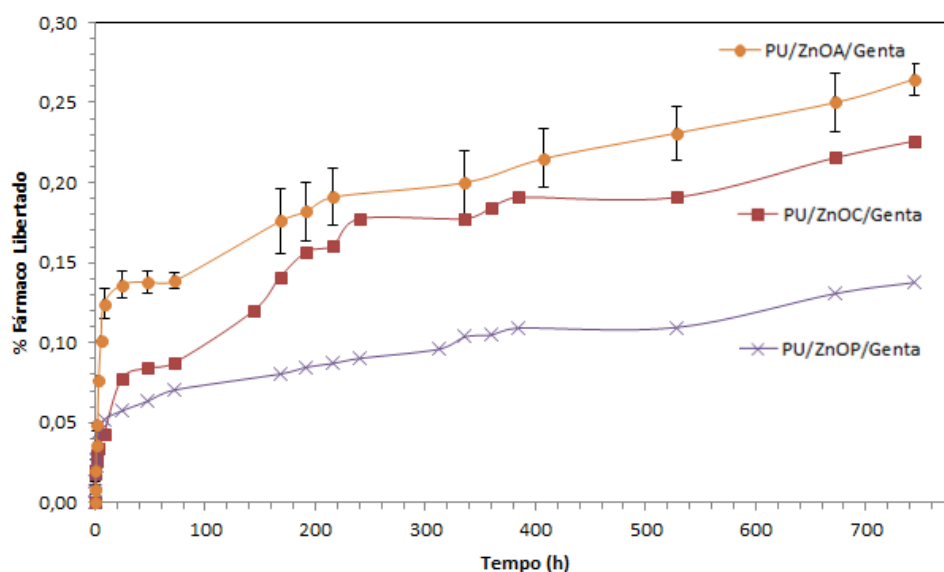


Figura 52 - Perfis de liberação da gentamicina (% de fármaco libertado) a partir dos diferentes compostos (PU/ZnOC, PU/ZnOP e PU/ZnOA).

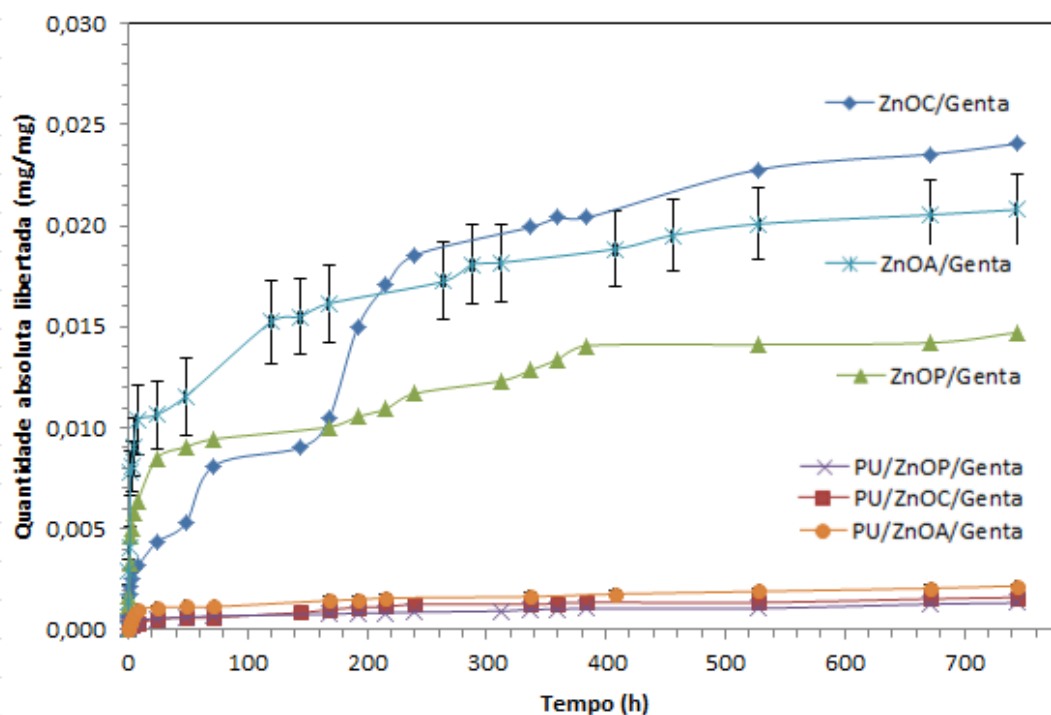


Figura 53 - Quantidade absoluta de gentamicina libertada a partir de nanopartículas de ZnO e dos respetivos compostos ao longo do tempo.

Observa-se que as posições relativas das curvas ZnOC e ZnOA se inverteram quando estes pós foram incorporados na matriz polimérica. O erro de leitura que deriva do método de deteção da gentamicina poderá ter tido alguma influência nestes resultados. À determinação da gentamicina estão associados erros derivados da medida indireta da gentamicina por UV na medida em que o



agente derivatizante pode não ter reagido totalmente com as amins primárias e, por essa via, subestimarem-se as concentrações de gentamicina. Acresce ainda que a variação do tempo de leitura pode também afetar as leituras no UV [78].

Tal como observado no caso do ibuprofeno, o comportamento dos compósitos em matéria de libertação da gentamicina é semelhante ao das nanopartículas, ou seja, observa-se que as curvas de libertação dos nanopartículas são replicadas pelas correspondentes curvas de libertação dos compósitos. O ZnOP/Genta e o PU/ZnOP/Genta são os sistemas que apresentam a menor percentagem de libertação, o que pode significar que a gentamicina adsorveu mais fortemente nas partículas ZnOP quando comparadas com as partículas ZnOA.

Na literatura, até a data, não foram encontrados estudos referentes a utilização da gentamicina em sistemas de nanopartículas de ZnO ou em compósitos de PU/ZnO. No entanto, a gentamicina já foi estudada em micropartículas de albumina [79]. Neste estudo, verificaram um perfil de libertação rápido nas primeiras seis horas apresentando uma libertação que varia consoante a concentração de gentamicina/micropartículas variando de 30-75% de gentamicina inicialmente [79]. Comparando estes resultados com os resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que as nanopartículas de ZnO retardam a libertação de gentamicina em relação ao sistema anteriormente apresentado. Uma diminuição da quantidade inicial pode ser desejável se existir a necessidade de minimizar os riscos de toxicidade da gentamicina (apresenta um baixo índice terapêutico).

Na seguinte tabela são apresentadas as principais observações referentes às Figura 51 e Figura 52.

Tabela 16 - Observações para as curvas de libertação da gentamicina em nanopartículas de ZnO e dos respetivos compósitos.

Característica/Amostras	ZnOC	ZnOP	ZnOA	PU/ZnOC	PU/ZnOP	PU/ZnOA
% Libertação inicial <i>(burst effect)</i>	+	++	+++	++	+	+++
% Libertação (Globalmente)	+++	+	++	++	+	+++

Legenda: variação da percentagem de fármaco libertado, de menor (+) até maior (+++).

Globalmente pode concluir-se que, para ambos os fármacos, as nanopartículas de ZnOC são as que apresentam maior taxa de libertação. O comportamento das curvas de libertação das várias amostras mostrou uma forte dependência com o tipo de fármaco pois existe uma inversão dos



comportamentos dos pós de ZnOA e ZnOP consoante o fármaco em estudo. Este resultado mostra que consoante o fármaco existe maior afinidade para as partículas de ZnOA ou ZnOP. O perfil de libertação depende então do tipo de ligação entre o fármaco e o transportador, do tamanho de poros e sua distribuição e dos coeficientes de difusão.

As curvas de libertação do fármaco gentamicina mostraram uma libertação contínua ao longo do tempo que se prolonga para além das 744h. Este resultado sugere que, tal como o ibuprofeno, pode ser aplicado em situações em que se pretenda prolongar a sua libertação no organismo [23]. Os dois sistemas de libertação em estudo neste trabalho (nanopartículas ou compósitos) apresentam-se como promissores no sentido de proporcionarem uma libertação controlada do fármaco.

Caracterização dos compósitos PU/ZnO após a libertação

De forma a contextualizar os resultados da libertação dos fármacos a partir dos compósitos produzidos observaram-se amostras de compósito ao fim de tempos pré-definidos de libertação no sentido de avaliar a possível degradação da estrutura dos compósitos ao longo do tempo.

Neste trabalho apenas se realizaram estudos de degradação da matriz polimérica no compósito PU/ZnOP/Ibu. As micrografias obtidas por SEM da evolução da microestrutura do compósito PU/ZnOP/Ibu ao longo do tempo, observada em superfície e em secção reta (*"Cross-section"*), encontram-se na Figura 54.

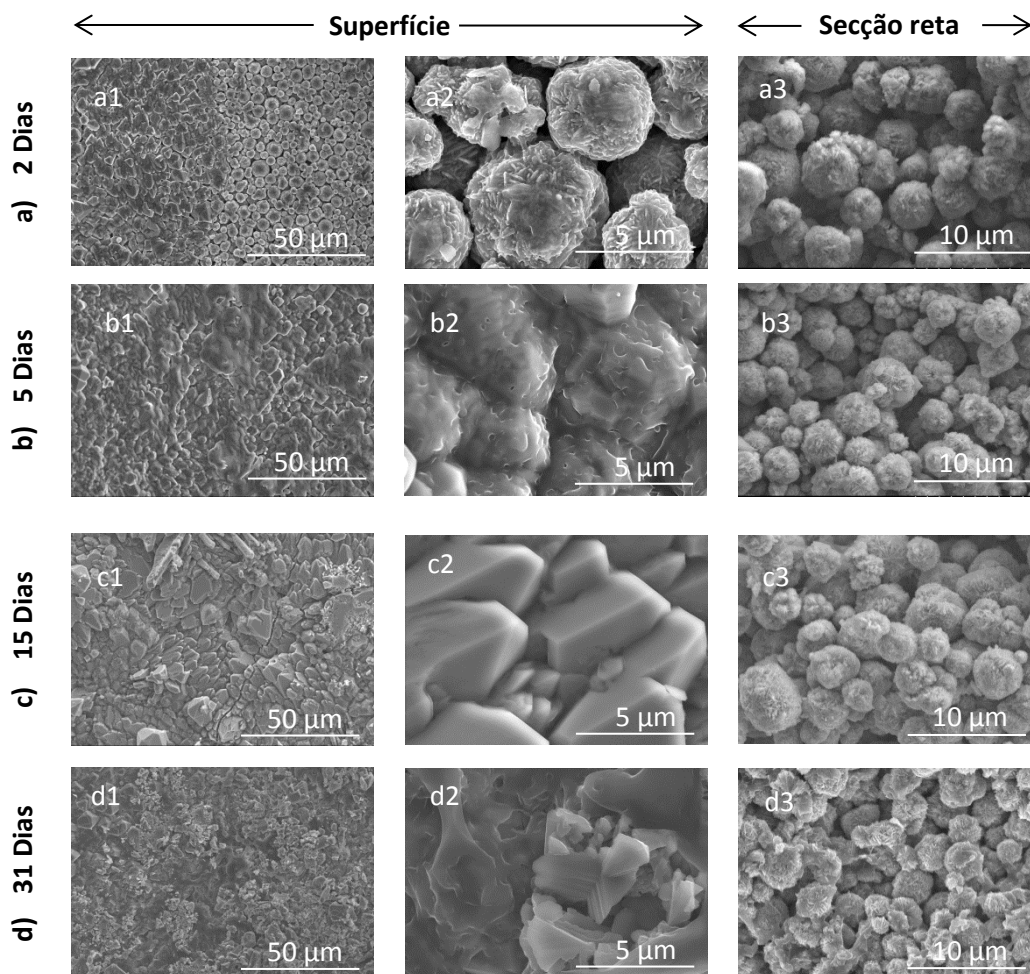


Figura 54 – Evolução da microestrutura do compósito PU/ZnOP com o tempo de libertação do ibuprofeno: após 2 dias (a), 5 dias (b), 15 dias (c) e 31 dias (d). As micrografias foram obtidas em superfícies de topo e em superfícies de corte (*secção reta*).

Observa-se a presença de nanopartículas à superfície do compósito, ao fim de um tempo de dois dias embora estas se apresentem distribuídas de forma irregular, ou seja, observam-se zonas de superfície com e sem nanopartículas de ZnO (Figura 54 (a1)). Este resultado sugere que durante a libertação do fármaco, logo nos primeiros dias, ocorre degradação da matriz polimérica e, por essa via, algumas nanopartículas vão ficando expostas ao meio exterior (fluido de libertação). Este comportamento poderá explicar o facto de a curva de libertação do fármaco a partir do compósito replicar a curva de libertação a partir das partículas nanoestruturadas. Atendendo a que este tipo de observação é comum aos vários compósitos estudados, sugere-se que o comportamento de degradação observado no compósito PU/ZnOP seja representativo dos comportamentos dos restantes compósitos.



Ao fim de 5 dias não se observaram nanopartículas à superfície da matriz polimérica (Figura 54 (b2)) devido à erosão superficial do poliuretano que permitiu a libertação da primeira camada de nanopartículas aprisionadas na matriz. Embora não se observem nanopartículas à superfície, a secção reta das amostras (Figura 54 (b3)) mostra a existência de nanopartículas aprisionadas no interior da matriz.

Ao fim de 15 e 31 dias a matriz polimérica manteve a sua integridade ou seja, foi capaz de reter as partículas de ZnO degradando-se muito lentamente (Figura 54 (c1 e d1)). Além disto, observa-se a presença de precipitados na superfície da matriz polimérica (Figura 54 (c2 e d2)) que derivam dos iões presentes na solução de PBS. Quando observada a secção reta das amostras (Figura 54 (c3 e d3)) não se verificam alterações no interior do compósito ou seja, continuam a existir nanopartículas aprisionadas no interior da matriz. Este resultado justifica a diminuição da libertação do fármaco a partir dos compósitos quando comparada com a das nanopartículas uma vez que a matriz polimérica funciona como uma barreira que dificulta a libertação do fármaco para o meio de libertação [89]. Por outro lado este resultado também sugere que deverá ser possível aumentar a percentagem de libertação dos compósitos alterando a estrutura do poliuretano.

Estes resultados podem ser generalizados para os restantes compósitos de PU/ZnO dado que os perfis de libertação a partir dos restantes compósitos apresentam grandes semelhanças pelo facto da libertação do fármaco ser fortemente retardada pela matriz polimérica.

Na Figura 55 e Figura 56 estão representados os difratogramas dos compósitos de PU/ZnOC/Ibu e PU/ZnOP/Ibu e PU/ZnOC/Genta PU/ZnOP/Genta depois da libertação dos fármacos, ao fim de 31 dias, verificando-se alterações relativamente aos difratogramas dos mesmos compósitos em situação de pré-libertação (Figura A2 e Figura A3).

Em todas as amostras se identifica a presença de fosfatos de sódio e zinco hidratados [$\text{Na}_6(\text{ZnPO}_4)_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ e $\text{NaZn}(\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{O})$] que resultam dos iões presentes na solução de PBS. Assim, sugere-se que os precipitados observados nas microestruturas durante os estudos da degradação polimérica (Figura 54) correspondam a estas fases cristalinas detetadas por DRX.

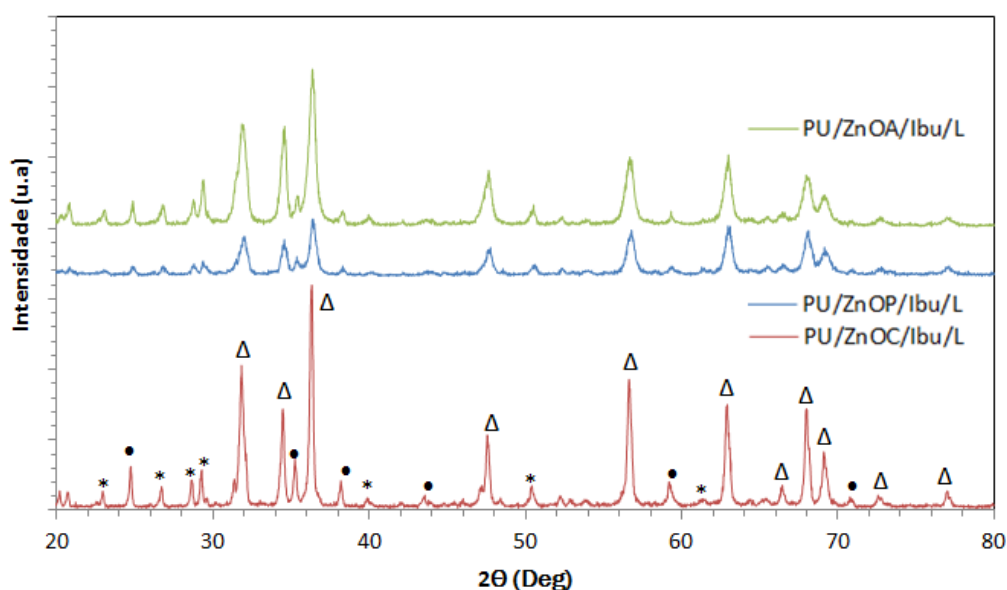


Figura 55 - Difratoograma de raio-X dos compósitos (—) PU/ZnOC/Ibu, (—) PU/ZnOP/Ibu e (—) PU/ZnOA/Ibu depois da libertação de IBU, ao fim de 31 dias. Legenda: Δ – ZnO; \bullet – $\text{Na}_6(\text{ZnPO}_4)_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ e * – $\text{NaZn}(\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{O})$.

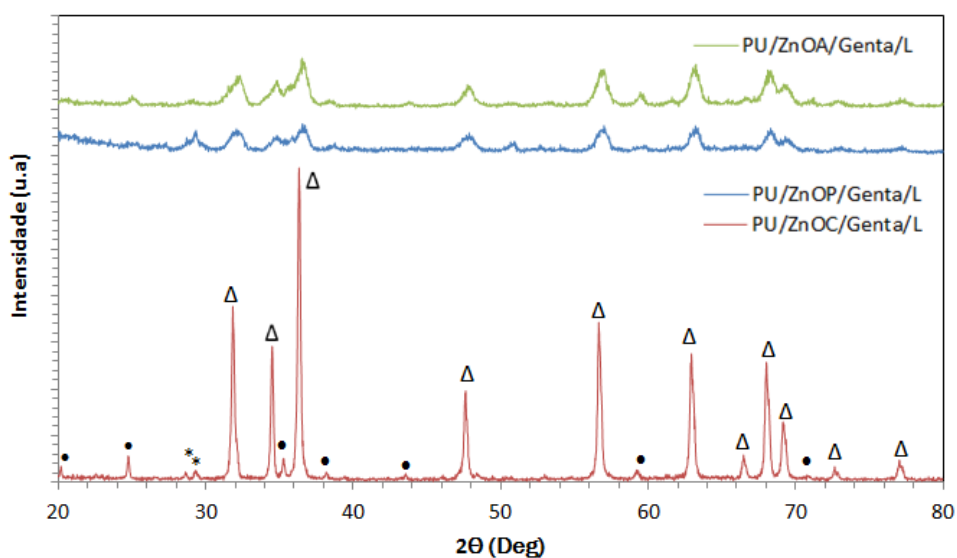


Figura 56 - Difratoograma de raio-X dos compósitos (—) PU/ZnOC/Genta e (—) PU/ZnOP/Genta e (—) PU/ZnOA/Genta depois da libertação de gentamicina, ao fim de 31 dias. Legenda: Δ – ZnO; \bullet – $\text{Na}_6(\text{ZnPO}_4)_6 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ e * – $\text{NaZn}(\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{O})$.

Os espectros de infravermelhos dos compósitos após libertação estão apresentados na Figura 57 e a identificação das respetivas bandas de absorção na Tabela 17.

A 3491 cm^{-1} observa-se a banda correspondente ao alongamento da ligação do grupo hidroxilo. As bandas a 2934 e a 2856 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento assimétrico da ligação C-H tanto



do poliéster como do ciclo hexano [85] e a 530 cm^{-1} identifica-se a banda referente à ligação Zn-O [84].

Observa-se o desaparecimento das bandas a 1963 cm^{-1} e a 1103 cm^{-1} correspondentes respetivamente ao alongamento da ligação C-O e ao alongamento assimétrico da ligação C-O-C do poliéter presentes no PU puro e o aparecimento de duas bandas a 1661 cm^{-1} e a 988 cm^{-1} devido provavelmente à presença de fosfatos de sódio e zinco na amostra. A 530 cm^{-1} observa-se a banda de absorção da ligação Zn-O confirmando a presença de nanopartículas nos compósitos após libertação [84].

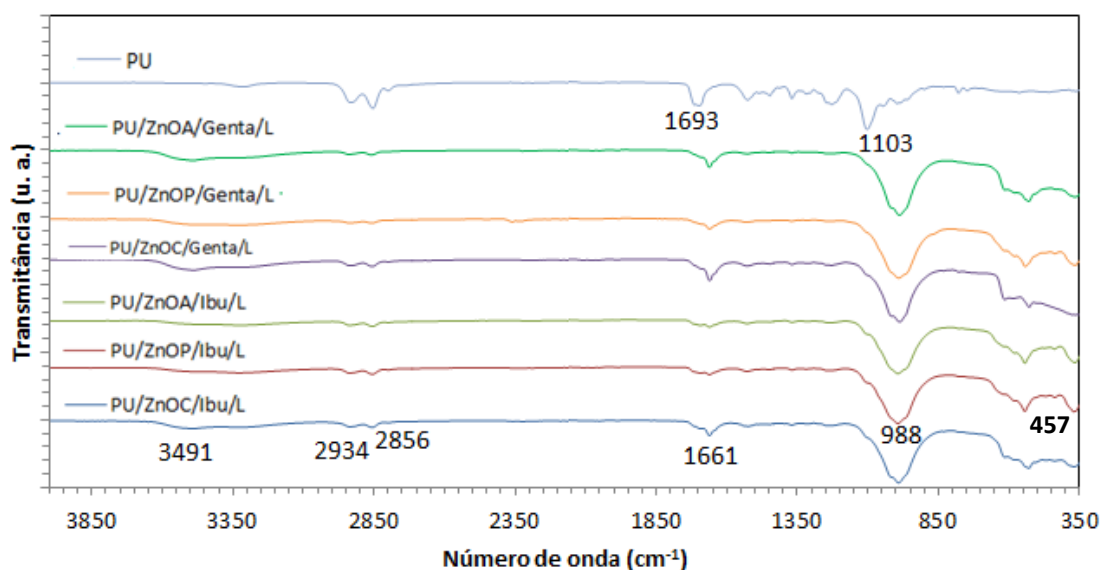


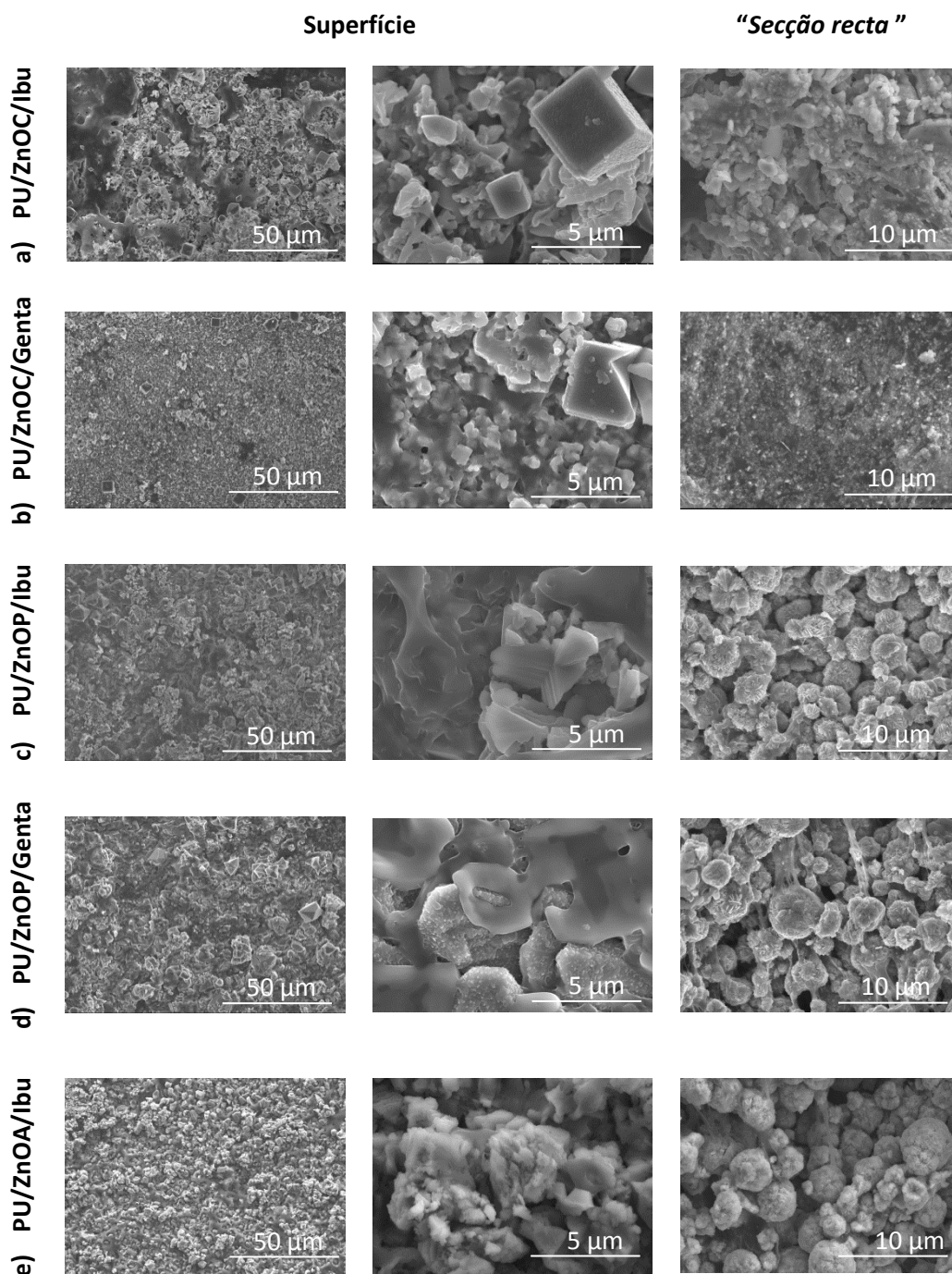
Figura 57 – Espectro de infravermelho das amostras (—) PU/ZnOC/Ibu, (—) PU/ZnOP/Ibu (—) PU/ZnOA/Ibu, (—) PU/ZnOC/Genta, (—) PU/ZnOP/Genta e (—) PU/ZnOA/Genta após libertação (ao fim de 31 dias) e do (—) PU puro.

Tabela 17 - Bandas de absorção, no infravermelho, indicadas na Figura 57.

Bandas de absorção no Infravermelho (cm^{-1})		Descrição
Presente trabalho	Referência	
3491	3438	Alongamento O-H
2934	2933 (PU)	Alongamento assimétrico CH_2 : C β do poliéter e ciclohexano
2856	2854 (PU)	Alongamento assimétrico CH_2 : C α /C β do poliéter e ciclohexano
457	445 (ZnO)	ZnO

Na Figura 58 apresentam-se as micrografias obtidas no SEM do compósito PU/ZnOP/ibu (Figura 58c) juntamente com as micrografias dos compósitos PU/ZnOC/Ibu, PU/ZnOC/Genta, PU/ZnOP/Genta, PU/ZnOA/Ibu e PU/ZnOA/Genta após libertação, ao fim de 31 dias. Globalmente

as figuras ilustram que não se observam alterações significativas em relação às micrografias obtidas após 31 dias de libertação dado que todos os compósitos produzidos apresentam uma degradação semelhante ao fim de 31 dias, independentemente do fármaco e das nanopartículas utilizadas. Observa-se ainda nas microestruturas a presença de sais de sódio detetados nos difratogramas correspondentes (Figuras 55 e 56).



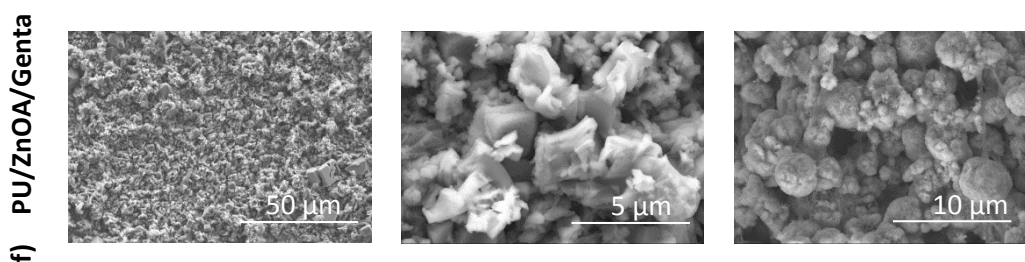


Figura 58 – Micrografias obtidas do SEM dos compósitos: a) PU/ZnOC/Ibu, b) PU/ZnOC/Genta, c) PU/ZnOP/Ibu, d) PU/ZnOP/Genta, e) PU/ZnOP/Ibu e f) PU/ZnOA/Genta.

Concluindo, foi possível utilizar quer nanopartículas de ZnO quer compósitos de PU/ZnO como sistemas de libertação de fármacos modelo. As curvas de libertação, em ambos os fármacos estudados, apresentam um comportamento que compreende três estágios: um estágio inicial de rápida libertação seguido de um estágio intermédio, de libertação mais lenta e, por fim, um terceiro estágio de velocidade nula ou quase nula. Os fármacos são transportados para o meio de libertação por difusão, devido ao gradiente de concentração. Assim, a elevada velocidade de libertação inicial reflete o elevado gradiente de concentração inicial; no estágio posterior a libertação e reflete outros contributos, possivelmente o da porosidade da partícula nanoestruturada.

A incorporação das nanopartículas numa matriz polimérica permite diminuir a velocidade de libertação dos fármacos de forma acentuada. Assim, a matriz polimérica atua como uma barreira que retarda acentuadamente a libertação. Verifica-se também que as curvas de libertação das nanopartículas são como replicadas das curvas de libertação apresentadas pelos compósitos.

O comportamento das curvas de libertação evidenciou uma forte dependência relativamente ao tipo de fármaco. O comportamento das partículas de ZnOA e de ZnOP relativamente à libertação do ibuprofeno e da gentamicina sugeriram que pós com baixa capacidade adsorptiva estabelecem ligações fortes com os adsorvatos e por isso apresentam-se menos suscetíveis à dessorção dos mesmos.

Os ensaios de degradação dos compósitos, permitiram observar que inicialmente existe uma degradação superficial da matriz polimérica que expõe as nanopartículas ao fluido de libertação. Posteriormente existe erosão superficial que é acompanhada pela formação de precipitados de fosfatos de sódio e zinco nos compósitos (visíveis das micrografias de SEM e posteriormente confirmados por DRX e FTIR). Estes precipitados dificultam a libertação do fármaco uma vez que as nanopartículas de ZnO ficam aprisionadas no interior da matriz. Assim, manipulando a degradabilidade do, polímero poder-se-á otimizar o perfil de libertação a partir dos sistemas



compósitos nanoparticulados por forma a obter sistemas com forte potencial para utilização em sistemas de libertação controlada de fármacos, nomeadamente em terapias anticancerígenas.



Capítulo V





5. Conclusões e Trabalho Futuro

No presente trabalho estudou-se a viabilidade de utilizar nanopartículas de ZnO e compósitos de ZnO/PU para incorporação de fármacos e posterior aplicação como sistemas de liberação controlada desses fármacos. O estudo contemplou as seguintes etapas: (i) síntese de nanopartículas de ZnO pelo método de precipitação química; (ii) carregamento, por adsorção, de dois fármacos modelos nas nanopartículas de ZnO – o ibuprofeno, como anti-inflamatório e a gentamicina como antibiótico; (iii) incorporação das nanopartículas de ZnO carregadas com o fármaco numa matriz polimérica, - o poliuretano *Tecoflex*[®] e por fim (iv) estudo *in vitro* da liberação dos fármacos a partir dos sistemas produzidos.

Na etapa de síntese de matérias foram produzidas nanopartículas de ZnO pelo método de precipitação química e obtiveram-se dois tipos de nanoestruturas de ZnO denominadas ZnOP e ZnOA, que foram comparados com nanopartículas de ZnO adquiridas comercialmente, ZnOC. As nanoestruturas ZnOP e ZnOA diferem no método de adição de reagentes utilizados na precipitação sendo as primeiras obtidas com recurso a um pulverizador e as segundas com a utilização de uma bureta. Os resultados obtidos permitiram verificar a influência da velocidade de adição dos reagentes na morfologia, área superficial específica e porosidade dos materiais. Assim, evidenciaram que os diferentes caudais de adição de reagentes, associados aos dois dispositivos usados, se refletiram em variações significativas de área superficial das partículas obtidas que se apresentaram como partículas nanoestruturadas de elevada área específica. As nanopartículas produzidas apresentaram uma única fase cristalina, *wurtzite*, e uma morfologia esférica constituída por subunidades em forma de nanoplacas com uma espessura média de 42 nm. Comparativamente com as nanopartículas comerciais, as nanopartículas precipitadas apresentaram uma maior área superficial específica, obtendo-se para o ZnOC, ZnOP e ZnOA os valores de respetivamente 14,8, 15,6 e 31,4 m²/g.

Os diferentes pós evidenciam capacidades adsorptivas (massa fármaco/unidade de área de partícula) diferentes o que denuncia estados de superfície diferentes que provavelmente refletem as diferenças das suas condições de síntese. Verificou-se que o pó ZnOA é aquele que evidencia menor capacidade adsorptiva.

Para um tempo de incubação de seis dias obteve-se para as NPsZnOA uma eficiência de carregamento de 86 e 53% para o ibuprofeno e gentamicina, respetivamente. No caso das NPsZnOC as percentagens foram de 84% para o ibuprofeno e 47% para gentamicina. O ZnOP apresenta uma eficiência de carregamento de 60% para o ibuprofeno e 65% para a gentamicina.



Os valores mais baixos de eficiência de carregamento poderão explicar-se pela presença de citratos nas nanopartículas, que não foram eliminados no processo de lavagem, e que poderão ocupar locais de adsorção do fármaco na superfície das nanopartículas. A presença dos fármacos foi confirmada em todas as nanoestruturas estudadas por análises de FTIR e Termogravimétrica.

As nanopartículas carregadas com os fármacos foram introduzidas com sucesso na matriz polimérica embora a confirmação da presença dos fármacos nos compósitos, por FTIR, se tenha revelado menos óbvia que no caso das nanopartículas carregadas.

Os estudos *in vitro* dos perfis de libertação permitiram verificar que, em ambos os fármacos, existe uma libertação com comportamento trifásico ou seja, com três estágios, em que a velocidade de libertação vai diminuindo ao longo do tempo. Os fármacos são transportados para o meio de libertação por difusão, devido ao gradiente de concentração.

As nanopartículas de ZnOA/Ibu apresentaram uma menor percentagem de libertação (34%) enquanto que, para as nanopartículas ZnOC/Ibu essa percentagem foi de, cerca de 72%. A gentamicina apresentou uma baixa taxa de libertação e com uma lenta cinética ao longo das 744 horas em que decorreram os ensaios. As nanopartículas de ZnOP/Genta apresentaram a menor taxa de libertação deste fármaco (11%) enquanto para as nanopartículas ZnOC/Genta a taxa de libertação foi maior, de cerca de 25%.

O comportamento das curvas de libertação evidenciou uma forte dependência relativamente ao tipo de fármaco. O comportamento das partículas de ZnOA e de ZnOP relativamente à libertação do ibuprofeno e da gentamicina sugeriram que pós com baixa capacidade adsorptiva estabelecem ligações fortes com os adsorvatos e por isso apresentam-se menos suscetíveis à desorção dos mesmos.

As curvas de libertação dos fármacos a partir dos compósitos apresentaram-se sempre inferiores às curvas de libertação das nanopartículas correspondentes devido ao facto da matriz polimérica exercer um efeito de barreira na libertação dos fármacos para o meio, agravado, nalguns casos pela formação, sobre a superfície dos compósitos, de precipitados contendo sódio e zinco e que constituem barreiras adicionais à libertação das drogas.

Como conclusão deve salientar-se que foi possível, neste trabalho, produzir nanopartículas de ZnO e compósitos PU/ZnO com potencialidades para virem a ser usados como sistemas de libertação de fármacos. Estas características associadas à toxicidade seletiva encontrada em trabalho anteriores nas nanopartículas de ZnO poderão contribuir para melhorar as atuais terapias anticancerígenas. Em particular, os compósitos com 50% de ZnO (massa de ZnO/ massa total do compósito) poderão servir para travar a proliferação celular e combater assim certas



formas de cancro. Estes compósitos, quando associados a um antibiótico como a gentamicina podem ser aplicados no tratamento localizado de tumores ósseos, como é o caso do osteossarcoma, ou quando associados ao ibuprofeno em terapias em que se pretende minimizar o processo inflamatório.

Trabalho Futuro

Como trabalho futuro sugere-se:

- Estudo da incorporação do fármaco por medidas de potencial zeta.
- Variação da concentração de fármaco inicial que é utilizada para carregar as nanopartículas de ZnO.
- Utilização de um álcool para a dissolução do ibuprofeno.
- Estudo da influência dos citratos na adsorção do fármaco nas nanopartículas de ZnO.
- Utilização de um fármaco anticancerígeno para potenciar a aplicação em terapias anticancerígenas ou mesmo a associação de vários fármacos no sentido de verificar a resposta das nanopartículas ao efeito sinérgico.
- Alteração do meio de libertação recorrendo a pHs diferentes.
- Aplicação dos modelos cinéticos da libertação.
- Realização de testes de bioatividade e biocompatibilidade.





Bibliografia

- [1] J. Conde, G. Doria e P. Baptista, "Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer," *Journal of Drug Delivery*, pp. 1-12, 2012.
- [2] "Globocan," International Agency for Research on Cancer, Cancer incidence, Mortality and Prevalence worldwide, 2008. [Online]. Available: <http://globocan.iarc.fr>. [Acedido em 21 3 2012].
- [3] O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie e R. Langer, "Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy," *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, vol. 103, pp. 6315-6320, 2006.
- [4] J. L. Luís, "Compósitos de PU/ZnO para aplicações biomédicas," *Tese de Mestrado de Engenharia de Materiais, Universidade de Aveiro*, 2011.
- [5] C. F. Santos, "Materiais fosfocálcicos para utilização em sistemas de libertação de fármacos," *Dissertação para obtenção de grau mestre em Engenharia de Materiais, Universidade de Aveiro*, 2005.
- [6] D. Lohmann, "Controlled Release-Recent Progress in Polymeric drug delivery systems," *Macromol. Symp.*, vol. 100, pp. 25-30, 1995.
- [7] K. H. Low, K. F. Leong, C. K. Chua, Z. H. Du e C. M. Cheah, "Drug release profile for traditional and controlled release devices," *Rapid Prototyping Journal*, vol. 7, pp. 262-267, 2001.
- [8] J. S. Moreira, "Estudos de síntese e cinética de libertação controlada em bionanocompósitos," *Dissertação para obtenção de grau mestre em Engenharia química, Universidade de Aveiro*, 2010.
- [9] J. Schierholz, "Drug delivery devices to enhance performance and improve outcome," *dds&s*, vol. 1, pp. 52-56, 2001.
- [10] W. H. Jong e P. J. Borm, "Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 3, pp. 133-149, 2008.
- [11] S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala e M. Amiji, "A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 126, n.º 3, pp. 187-204, 2008.
- [12] J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka e D. G. Wingett, "Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications," *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 7, n.º 9, pp. 1063-1077, 2010.
- [13] A. H. Faraji e P. Wipf, "Nanoparticles in cellular drug delivery," *Bioorgan. Med. Chem.*, vol. 17, pp. 2950-2962, 2009.
- [14] M. Xue-Yong e Z. Wei-De, "Effects of flower-like ZnO nanowhiskers on the mechanical, thermal and antibacterial properties of waterborne polyurethane," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 94, pp. 1103-1109, 2009.
- [15] B. Ashe, "Thesis: A Detail investigation to observe the effect of zinc oxide and Silver



- nanoparticles in biological system,” em *Department of Biotechnology & Medical Engineering, National Institute Of Technology*, India, 2011.
- [16] U. Özgür, Y. I. Alivov, C. Liu, A. Teke e M. Reshchikov, “A comprehensive review of ZnO materials and devices,” *Journal of Applied Physics*, vol. 98, pp. 2-7, 2005.
- [17] Z. L. Wang, “Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications - Review,” *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 16, pp. R829-R858, 2004.
- [18] S. J. Pearton, D. P. Norton, K. Ip, Y. W. Heo e T. Steiner, “Recent progress in processing and properties of ZnO,” *Superlattices and Microstructures*, vol. 34, pp. 3-32, 2003.
- [19] K. M. Parida, S. S. Dash e D. P. Das, “Physico-chemical characterization and photocatalytic activity of zinc oxide prepared by various methods,” *Journal of colloid and interface science*, vol. 298, pp. 787-93, 2006.
- [20] J. Ye, R. Zhou, C. Zheng, Q. Sun, Y. Lv, C. Li e X. Hou, “Size-controllable synthesis of spherical ZnO nanoparticles: Size- and concentration-dependent resonant light scattering,” *Microchemical Journal*, vol. 100, pp. 61-65, 2012.
- [21] C. Chen, P. Liu e C. Lu, “Synthesis and characterization of nano-sized ZnO powders by direct precipitation method,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 144, pp. 509-513, 2008.
- [22] Q. Yuan, S. Hein e R. D. K. Misra, “New generation of chitosan-encapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: Synthesis, characterization and in vitro drug delivery response,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 2732-2739, 2010.
- [23] H. Zhang, B. Chen, H. Jiang, C. Wang, H. Wang e X. Wang, “A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment,” *Biomaterials*, vol. 32, pp. 1906-14, 2011.
- [24] N. Ramarathnam, T. Osawa, H. Ochi e S. Kawakishi, “The contribution of plant food antioxidants to human health,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 6, n.º 3, pp. 75-82, 1995.
- [25] D. Guo, C. Wu, H. Jiang, Q. Li, X. Wang e B. Chen, “Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation,” *J Photochem Photobiol B.*, vol. 93, n.º 3, pp. 119-26, 2008.
- [26] C. Hanley, J. Layne, A. Punnoose, K. M. Reddy, I. Coombs e A. e. a. Coombs, “Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 19, n.º 29, p. 295103, 2008.
- [27] H. Wang, D. Wingett, M. H. Engelhard, K. Feris, K. M. Reddy, P. Turner, J. Layne, C. Hanley, J. Bell e D. Tenne, “Fluorescent dye encapsulated ZnO particles with cell-specific toxicity for potential use in biomedical applications,” *Journal of materials science: materials in medicine*, vol. 20, pp. 11-22, 2009.
- [28] F. Muhammad, M. Guo, Y. Guo, W. Qi, F. Qu, F. Sun e H. e. a. Zhao, “Acid degradable ZnO quantum dots as a platform for targeted delivery of an anticancer drug,” *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, pp. 13406-13412, 2011.
- [29] K. C. Barick, S. Nigam e D. Bahadur, “Nanoscale assembly of mesoporous ZnO: A potential drug carrier,” *J. Mater. Chem*, vol. 20, pp. 6446-6452, 2010.



- [30] W. Smith, *Princípios de Ciência e Engenharia dos Materiais*, Lisboa: Mc Graw-Hill, 1998.
- [31] G. T. Howard , “Biodegradation of polyurethane: a review,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 49, n.º 4, pp. 245-252, 2002.
- [32] F. Portugal, “Desenvolvimento, Otimização e Aplicações de Novas Fases Poliméricas para Extração Sortiva em Barras de Agitação,” *Tese de Doutoramento em Química, Universidade de Lisboa*, 2010.
- [33] A. L. Silva e J. C. Bordado, “Recent Developments in Polyurethane Catalysis: Catalytic Mechanisms Review,” *Catalysis Reviews: Science and Engineering*, vol. 46, pp. 31-51, 2008.
- [34] P. Vermette, H. J. Griesser, G. Laroche e R. Guidoin, “Tissue Engineering Intelligence Unit 6,” em *Biomedical Applications of Polyurethanes*, Georgetown, Texas U.S.A., Landes Bioscience, 2001.
- [35] R. Jayakumar, S. Nanjundan e M. Prabakaran, “Metal-containing polyurethanes, poly(urethane–urea)s and poly(urethane–ether)s: A review,” *Reactive & Functional Polymers*, vol. 66, pp. 299-314, 2006.
- [36] J. P. Santerre, K. Woodhouse, G. Laroche e R. S. Labow, “Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 7457-7470, 2005.
- [37] I. P. M. Fernandes, “Dispersões Aquosas de Poliuretano e Poliuretano- ureia,” *Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, Instituto Politécnico de Bragança*, 2008.
- [38] L. S. Nair e C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials,” *Progress in Polymer Science*, vol. 32, n.º 8-9, pp. 762-798, 2007.
- [39] H. B. P. Machado, *Suportes compósitos Poliuretano/HA para aplicações ósseas de longo termo*, Universidade de Aveiro: Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro (DECV), 2007.
- [40] J. H. Li, R. Y. Hong, M. Y. Li, H. Z. Li, Y. Zheng e J. Ding, “Effects of ZnO nanoparticles on the mechanical and antibacterial properties of polyurethane coatings,” *Progress in Organic Coatings*, vol. 64, n.º 4, pp. 504-509, 2009.
- [41] R. S. Harisha, K. M. Hosamani, R. S. Keri, N. Shelke, V. K. Wadi e T. M. Aminabhavi, “Controlled release of 5-fluorouracil from biomedical polyurethanes,” *J. Chem. Sci.*, vol. 122, pp. 209-216, 2010.
- [42] F. Crisante, I. Francolini, M. Bellusci, A. Martinelli, L. D'Ilario e A. Piozzi, “Antibiotic delivery polyurethanes containing albumin and polyallylamine nanoparticles,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 36, pp. 555-564, 2009.
- [43] A. Martinelli, L. D'Ilario, L. Francolini e A. Piozzi, “Water state effect on drug release from an antibiotic loaded polyurethane matrix containing albumin nanoparticles,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 407, pp. 197-206, 2011.
- [44] H. Liu, L. Zhang, P. Shi, Q. Zou, Y. Zuo e Y. Li, “Hydroxyapatite/polyurethane scaffold incorporated with drug-loaded ethyl cellulose microspheres for bone regeneration,” *Journal*



of *Biomedical Materials Research B: applied biomaterials*, vol. 95B, 2010.

- [45] G. R. Silva, E. Ayres, R. L. Orefice, S. A. L. Moura, D. C. Cara e A. S. C. Jr., "Controlled release of dexamethasone acetate from biodegradable and biocompatible polyurethane and polyurethane nanocomposite," *Journal of Drug Targeting*, vol. 17, n.º 5, pp. 374-383, 2009.
- [46] G. R. Silva, J. A. S. Cunha, F. Behar-Cohenc, E. Ayres e R. L. Orefice, "Biodegradable polyurethane nanocomposites containing dexamethasone for ocular route," *Materials Science and Engineering*, vol. 31, n.º 2, pp. 414 - 422 , 2011.
- [47] P. Losi, E. Briganti, A. Magera, D. Spiller, C. Ristori, M. Balderi, S. Kull, A. Balbarini, R. D. Stefano, B. Battolla e G. Soldani, "Tissue response to poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane fibrin composite scaffolds for controlled delivery of proangiogenic growth factors," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 5336-5344, 2010.
- [48] B. Li, T. Yoshii, A. E. Hafeman, J. S. Nyman, J. C. Wenke e S. A. Guelcher, "The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 6768-6779, 2009.
- [49] A. E. Hafeman, B. Li, T. Yoshii, K. Zienkiewicz, J. M. Davidson e S. A. Guelcher, "Injectable biodegradable polyurethane scaffolds with release of platelet-derived growth factor for tissue repair and regeneration," *Pharma. Res.*, vol. 25, pp. 2387-2399, 2008.
- [50] A. M. D. Figueiredo, "Preparação e caracterização de micropartículas de polissacáridos para libertação controlada de fármacos anticancerígenos no cólon," *Dissertação para obtenção de grau de mestre em Engenharia Química e Bioquímica, Universidade nova de Lisboa*, 2011.
- [51] K. Stokes, R. McVenes e J. Anderson, "Polyurethane elastomer biostability," *J Biomater Appl*, vol. 9, n.º 4, pp. 321-54, 1995.
- [52] W. D. C. Callister, *Materials Science and Engineering - An introduction*, United States of America: John Wiley & Sons, Inc, 2007.
- [53] A. P. Kumar, D. Depan, N. S. Tomer e R. P. Singh, "Nanoscale particles for polymer degradation and stabilization-Trends and future perspectives," *Progress in Polymer Science*, vol. 34, pp. 479-515, 2009.
- [54] S. Pinto, "Síntese e Caracterização de Bio-Compósitos Condutores a Partir de Nanopartículas de Polipirrole e P(TMC-CL)," *Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto*, 2008.
- [55] L. d. Neurocirurgia, "Neurologia Clínica e Neurocirurgia," [Online]. Available: <http://www.sistemanervoso.com/>. [Acedido em 5 10 2012].
- [56] J. T. Seil e T. J. Webster, "Decreased astroglial cell adhesion and proliferation on zinc oxide nanoparticle polyurethane composites," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 4, pp. 523-531, 2008.
- [57] H. J. Xiang, J. Yang, J. G. Hou e Q. Zhu, "Piezoelectricity in ZnO nanowires: a first principles study," *Applied Physics Letters*, vol. 89, 2006.
- [58] C. Soundrapandian, B. Sa e S. Datta, "Review Organic-Inorganic Composites for Bone Drug Delivery," *AAPS Pharm. Sci. Tech*, vol. 10, n.º 4, 2009.
- [59] K. D. Rainsford, "Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety," *Inflammopharmacology*,



vol. 17, n.º 6, pp. 275-342, 2009.

- [60] S. Lerdkanchanaporn e D. Dollimore, "A thermal analysis study of ibuprofen," *Journal of Thermal Analysis*, vol. 49, pp. 879-886, 1997.
- [61] P. O. Carvalho, Q. B. Cass, S. A. Calafatti, F. J. Contesini e R. Bizaco, "Alternatives for the separation of drug enantiomers: ibuprofen as a model compound," *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 23, pp. 291-300, 2006.
- [62] F. Higton, "The pharmaceuticals of ibuprofen," em *Ibuprofen: A Critical Bibliographic Review*, Estados Unidos, CRC Press, 1999, pp. 55-64.
- [63] R. Bushra e N. Aslam, "An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen," *Oman Med J*, vol. 25, pp. 155-166, 2010.
- [64] P. Lopes, *Cimentos ósseos acrílicos modificados em enchimentos bioativos e biodegradáveis*, Aveiro: Dissertação para obtenção de grau de Doutor em Engenharia Biomédica, 2012.
- [65] "Who Model List of Essential Medicines," March 2011. [Online]. Available: http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf. [Acedido em 3 5 2012].
- [66] MedlinePlus, "Ibuprofen," MedlinePlus, [Online]. Available: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682159.html>. [Acedido em 05 10 2012].
- [67] INFARMED, "Folheto informativo Brufen," 10 04 2012. [Online]. Available: http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=1258&tipo_doc=fi. [Acedido em 05 05 2012].
- [68] F. Carballido, R. H. Vanrell, I. Martínez e P. Pastoriza, "Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: Effect of Labrafil addition on release in vitro," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 279, n.º 1-2, pp. 33-41, 2004.
- [69] H. Zhang, Z. Li, P. Xu, R. Wu, L. Wang e Y. Xiang, "Synthesis of novel mesoporous silica nanoparticles for loading and release of ibuprofen," *Journal of Controlled Release*, vol. 152, pp. 1-132, 2011.
- [70] Z. Chen, X. Li, H. He, Z. Ren, Y. Liu, J. Wang e Z. Li, "Mesoporous silica nanoparticles with manipulated microstructures for drug delivery," *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 2012.
- [71] L. H. M. L. M. Santos, "Análise Automática de Gentamicina por Quimiluminescência," Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2008.
- [72] P. R. M. Magalhães, "Análise da Monitorização Farmacocinética da Gentamicina nos Serviços Farmacêuticos do CHCB," *Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas*, Universidade da Beira Interior, 2012.
- [73] INFARMED, "Folheto informativo Gentamicina," 20 11 2006. [Online]. Available: http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=3884&tipo_doc=fi. [Acedido em 2012 5 12].
- [74] S. Yoshizawa, D. Fourmy e J. D. Puglisi, "Structural origins of gentamicin antibiotic action," *The EMBO Journal*, vol. 17, pp. 6437-6448, 1998.



- [75] F. L. Llorente, L. Parés, I. Ajuria, F. Bandres, B. Castanyer e F. Campos, "State of the art in therapeutic drug monitoring," *Clin Chem Lab Med*, vol. 48, n.º 4, pp. 437-46, 2010.
- [76] Y. Wang, X. Wang, K. Wei, N. Zhao, S. Zhang e J. Chen, "Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres," *Materials Letters*, vol. 61, n.º 4-5, pp. 1071-1076, 2007.
- [77] H. Li e J. Chang, "Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from PHBV/wollastonite composite microspheres," *Journal of Controlled Release*, vol. 107, n.º 3, pp. 463-73, 2005.
- [78] P. F. Cabanillas, E. D. Pena, J. M. Barrales-Rienda e G. Frutos, "Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 209, pp. 15-26, 2000.
- [79] G. D. Porta, R. Adami, P. Gaudio, L. Prota, L. Aquino e E. Reverchon, "Albumin/Gentamicin Microspheres Produced by Supercritical Assisted Atomization: Optimization of Size, Drug Loading and Release," *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, n.º 11, pp. 4720-9, 2010.
- [80] Visking, "Medicell International Ltd," 13 9 2004. [Online]. Available: <http://www.visking.com/>. [Acedido em 18 7 2012].
- [81] K. S. W. Sing, D. H. Everett, . R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquérol e T. Siemieniewska, "Reporting Physisorption Data For Gas/Solid Systems," *Pure & Appl. Chem.*, vol. 57, n.º 4, pp. 603-619, 1985.
- [82] S. Chakraborty, A. Kole e P. Kumbhakar, "Room temperature chemical synthesis of flower-like ZnO nanostructures," *Materials Letters*, vol. 67, pp. 362-364, 2012.
- [83] W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke e Q. Chaudhry, "A complementary definition of nanomaterial," *Nano Today*, vol. 5, pp. 165-168, 2010.
- [84] V. Parthasarathi e G. Thilagavathi, "Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles and its application on fabrics for microbe resistant defence clothing," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, n.º 4, 2011.
- [85] C. Guignot, N. Betz, B. Legendre, A. Moel e N. Yagoubi, "Degradation of segmented poly(etherurethane) Tecoflex® induced by electron beam irradiation: Characterization and evaluation," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, vol. 185, pp. 100-107, 2001.
- [86] S. Ramukutty e E. Ramachandran, "Growth, spectral and thermal studies of ibuprofen crystals," *Cryst. Res. Technol*, vol. 47, n.º 1, pp. 31-38, 2012.
- [87] A. Thakur, R. K. Wanchoo e P. Singh, "Hydrogels of Poly(acrylamide-co-acrylic acid): In-vitro Study on Release of Gentamicin Sulfate," *Chem. Biochem. Eng. Q.*, vol. 25, n.º 4, pp. 471-482, 2011.
- [88] N. Manjunatha, S. Vasanti, S. Rajesh e N. Uma, "Formulation and evaluation of biopolymer based microspheres for nasal drug delivery," *International Journal of PharmTech Research*, vol. 2, n.º 1, pp. 856-862, 2010.
- [89] G. Maruthi, A. A. Smith e R. Manavalan, "Nanoparticles – A Review," *Journal of Advanced*



Scientific Research, vol. 2, n.º 4, pp. 12-19, 2011.

- [90] M. Hamoudeh, R. Diab, H. Fessi, C. Dumontet e D. Cuchet, "Paclitaxel-loaded microparticles for intratumoral administration via the TMT technique: preparation, characterization, and preliminary antitumoral evaluation," *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 34, n.º 7, pp. 698-707, 2008.





Anexos

Análise efetuada a água resultante das lavagens através da técnica de absorção atômica.

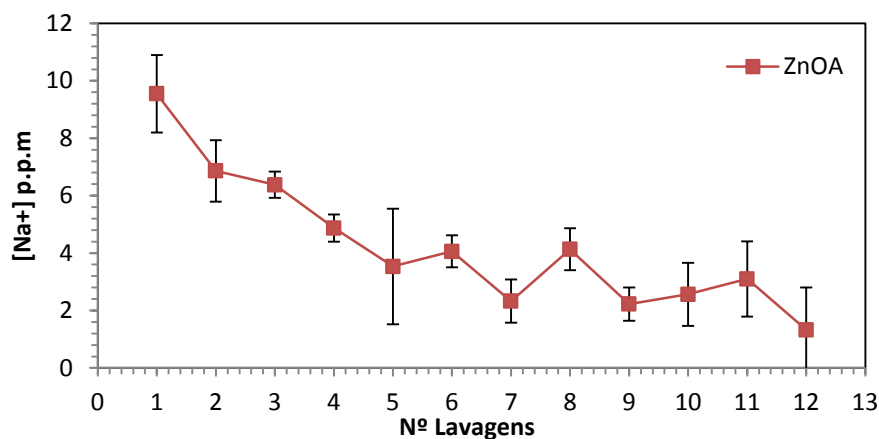


Figura A1 – Concentração de Na^+ medido através da técnica de AAS ao longo das lavagens efetuadas para amostra de ZnOA.

Difratogramas de raio-X

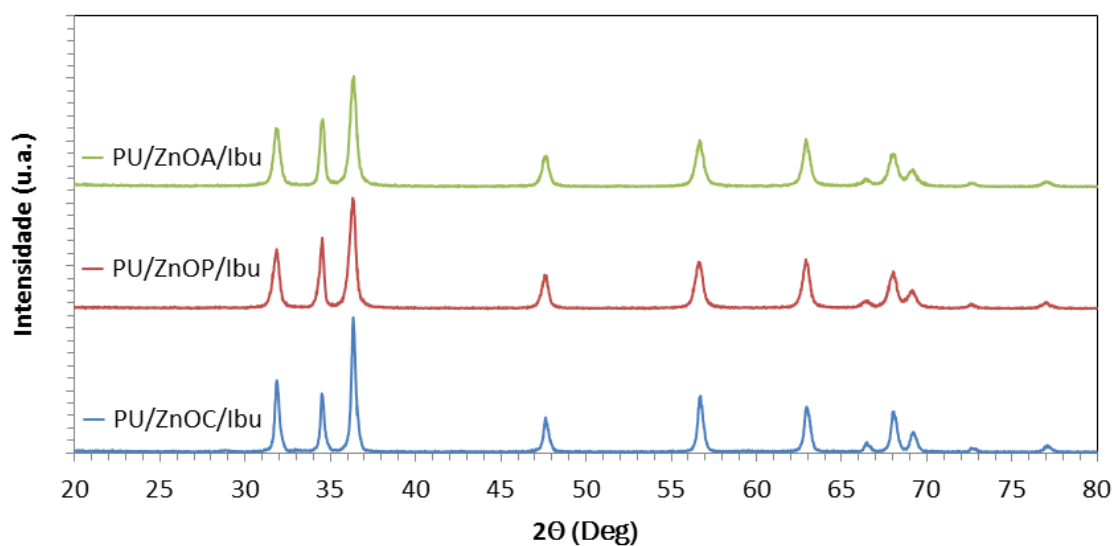


Figura A2 – Difratograma dos compósitos (—) PU/ZnOC/Ibu (—) PU/ZnOP/Ibu e (—) PU/ZnOA/Ibu.

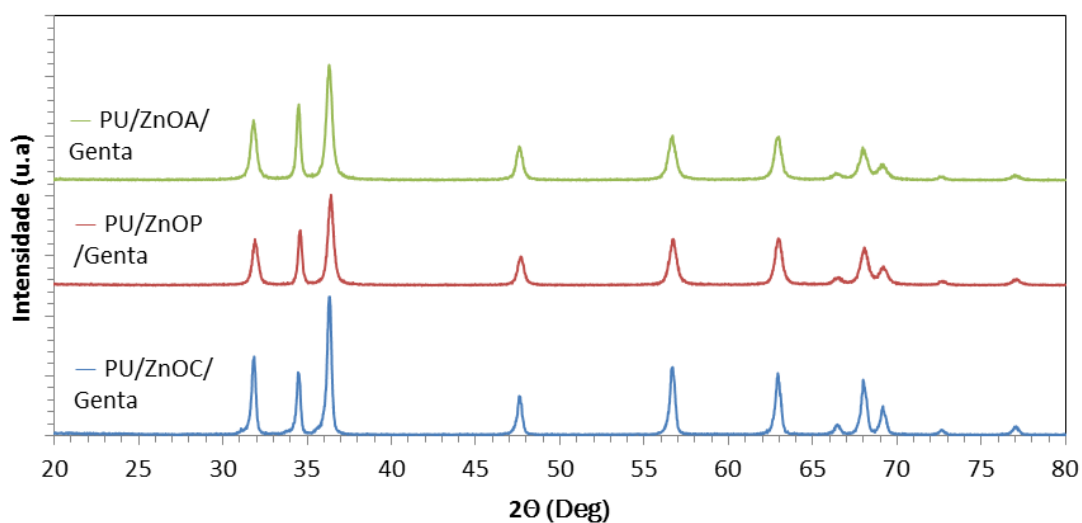


Figura A3 – Difratoograma dos compósitos (—) PU/ZnOC/Genta, (—) PU/ZnOP/Genta e (—) PU/ZnOA/Genta.

Ensaio de carregamento e liberação

Os espectros de ibuprofeno e gentamicina foram obtidos através de várias soluções de PBS com diferentes concentrações de fármaco de modo a determinar o pico de absorvância correspondente a cada fármaco. As absorvâncias foram medidas por espectroscopia de UV-Visível.

Na Figura A4 e Figura A5 estão representados os espectros de absorvância para o ibuprofeno e para a gentamicina, respetivamente. Assim, as análises foram conduzidas no comprimento de onda de 264 nm para o ibuprofeno e de 332 nm para a gentamicina.

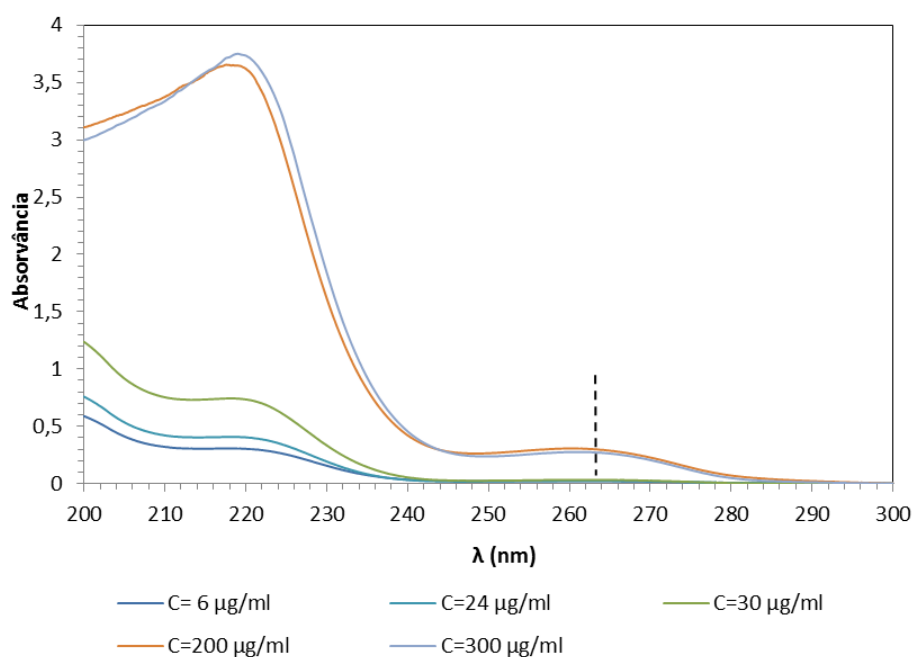


Figura A4 – Espectros obtidos da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de ibuprofeno com concentrações conhecidas.

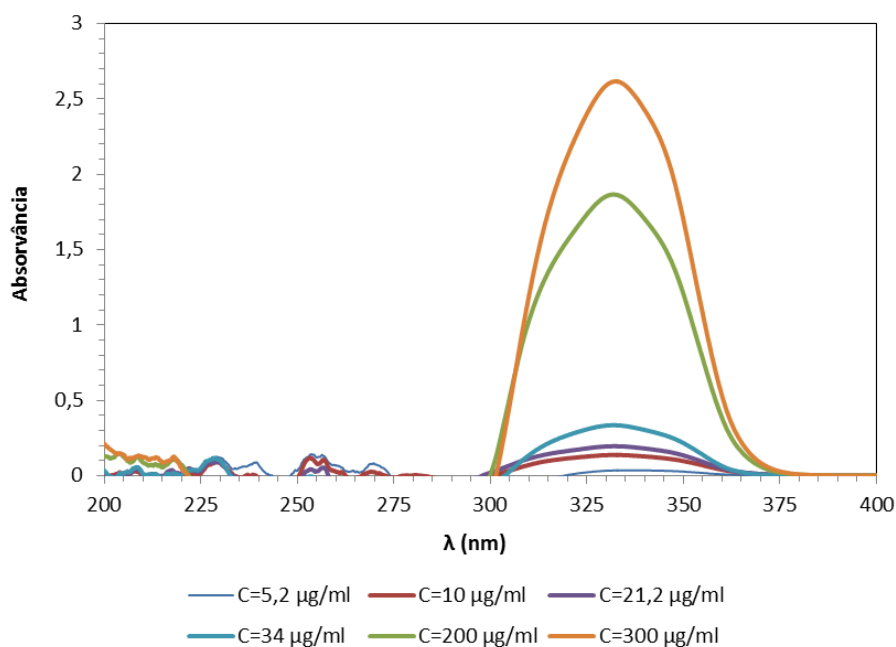


Figura A5 - Espectros obtidos da absorvância em função do comprimento de onda para soluções de gentamicina com concentrações conhecidas.



Para quantificar os fármacos estabeleceu-se a correspondência entre a absorvância dos fármacos, no comprimento de onda respetivo, e a concentração de fármaco em solução, permitindo assim traçar curvas de calibração usando soluções aquosas de fármaco de concentração conhecida. Para os estudos de carregamento o solvente utilizado foi água desionizada. No entanto, para os estudos de libertação o solvente utilizado foi PBS. Nas Figuras A6 e A7 estão representadas as retas de calibração para o ibuprofeno em que o solvente é água desionizada e PBS, respetivamente. Nas Figuras A8 e A9 estão representadas as retas de calibração para a gentamicina em que o solvente é água desionizada e PBS, respetivamente.

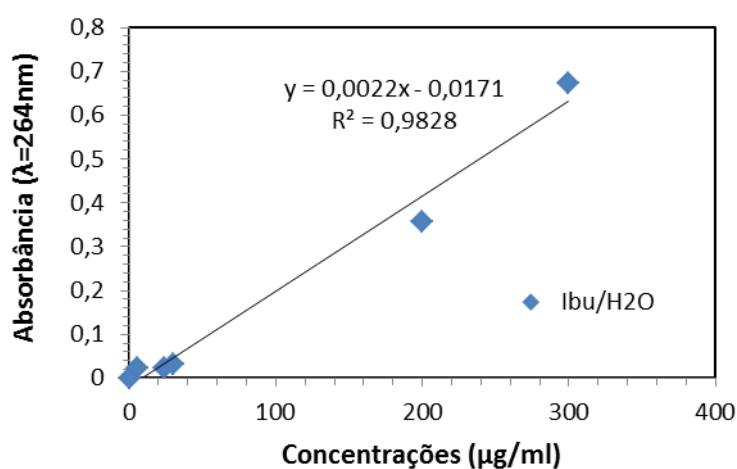


Figura A6 - Reta de calibração para o ibuprofeno (solvente água).

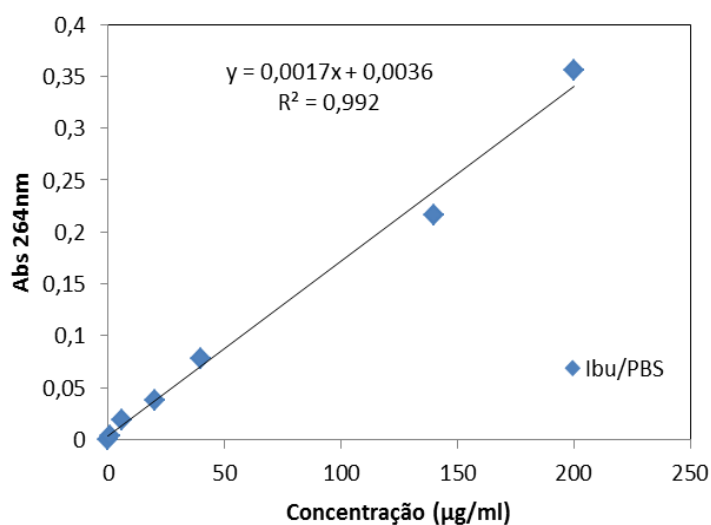


Figura A8 - Reta de calibração para o ibuprofeno (solvente PBS).

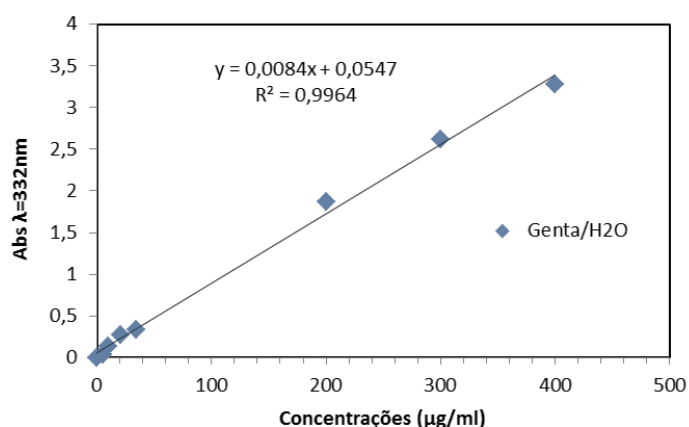


Figura A8 - Reta de calibração para a gentamicina (solvente água).

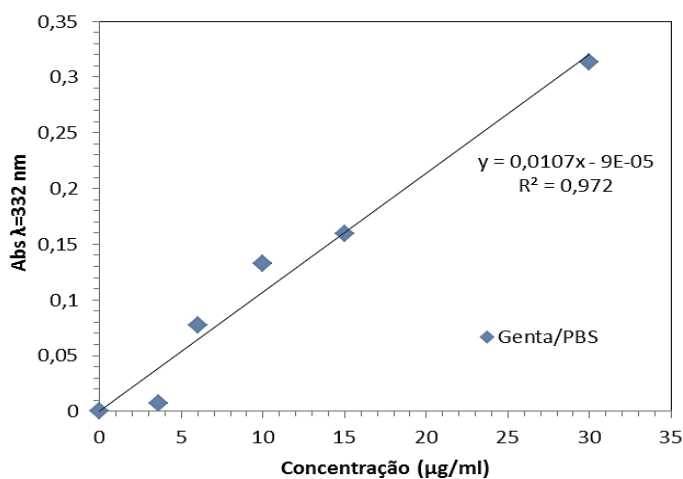


Figura A9 - Reta de calibração para a gentamicina (solvente PBS).

Eficiência de Carregamento (cálculos)

O carregamento foi realizado por adsorção direta dos fármacos. Analisaram-se por espectrofotometria de UV todas as soluções, isto é, solução sobrenadante e solução de lavagem, para quantificar o fármaco adsorvido pelas nanopartículas de ZnO. As análises foram conduzidas no comprimento de onda de 264 nm para o ibuprofeno e de 332 nm para a gentamicina.

Assim, através das rectas de calibração (em que o solvente é água desionizada) do ibuprofeno e da gentamicina determina-se a concentração de fármaco na solução (μg/ml).

As regressões lineares determinadas são:



$$\begin{array}{lll} y = 0,0022x - 0,0171 & R^2 = 0,9828 & \text{Ibuprofeno} \\ y = 0,0084x + 0,0547 & R^2 = 0,9964 & \text{Gentamicina} \end{array}$$

Através da concentração determinada quer da solução sobrenadante e quer da solução de lavagem, determina-se a massa de fármaco não carregados nas nanopartículas. Ou seja, multiplicando a concentração pelo volume resultante da ultracentrifugação quer do sobrenadante quer da solução de lavagem, obtemos a massa de fármaco não carregado.

$$C = \frac{m}{v} \Leftrightarrow m = C \times v \quad (\mu\text{g})$$

$$\begin{aligned} \text{Massa de fármaco não carregado} &= \\ &= \text{massa de fármaco no sobrenadante} + \text{massa de fármaco das lavagens} \end{aligned}$$

Seguidamente, como a massa de fármaco inicial é conhecida facilmente se determina pela diferença a quantidade de fármaco efetivamente carregado nas nanopartículas.

A quantidade de fármaco adsorvido considerou-se ser a diferença entre a inicial e o somatório das quantidades de fármaco encontradas na solução (sobrenadante inicial e resultante das várias lavagens). Estes valores permitiram obter a eficiência de carregamento, calculada como a razão percentual entre a quantidade de fármaco adsorvida e a quantidade disponibilizada de fármaco na solução inicial.

$$\begin{aligned} \% \text{ Eficiência de Carregamento} &= \\ &= \frac{\text{Massa de fármaco inicial} - \text{Massa de fármaco não carregado}}{\text{Massa de fármaco inicial}} \times 100 \end{aligned}$$

A quantidade de fármaco efetivamente carregado nas nanopartículas também pode ser expressa em quantidade de fármaco por nanopartícula (mg/mg).

Percentagem de fármaco libertado (cálculos)

Os ensaios de libertação foram realizados em PBS e segundo tempos pré-definidos ou seja são realizadas tomas de líquido ao fim de algum tempo com reposição de igual volume de PBS. O



líquido de cada toma é então analisado por espectroscopia de UV em que se determina a sua concentração da solução através das retas de calibração anteriormente referidas em que o solvente corresponde ao PBS.

$$\text{Concentração} = \frac{(\text{absorvância} - b)}{m}$$

Através da concentração e tendo em conta o volume de reposição e o volume em que os sistemas são colocados a libertar calcula-se a massa de fármaco libertado. A percentagem de fármaco libertado é determinada pela seguinte equação:

$$\% \text{ fármaco libertado} = \frac{\text{Massa de fármaco libertado}}{\text{Massa de fármaco presente nas nanopartículas}} \times 100$$

Por exemplo:

- Massa de fármaco libertado em t=10 min (m1)

$$m1 = m1' + m1''$$

em que $m1' + m1'' = cf \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times 3\text{ml} + cf \text{ (}\mu\text{g/ml)} \times 197\text{ml} \rightarrow cf = \text{concentração de fármaco}$

- Massa de fármaco libertado em t=30 min (m2)

$$m2 = m1 + m2' + m2''$$

- Massa de fármaco libertado em t=60 min (m3)

$$m3 = m1 + m2 + m3' + m3''$$

e assim sucessivamente.

Quantidade absoluta de fármaco libertado:

$$\text{Quantidade absoluta de fármaco} = \frac{\text{massa de fármaco}}{\text{massa de nanopartículas libertadas}} \text{ (mg/mg)}$$

- Massa de nanopartículas nos sacos de diálise=10 mg
- Massa de nanopartículas nos compósitos =75 mg